



# **I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA**

## **Energia e Sustentabilidade**

**23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB**

### **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ELUCIDAÇÃO DO PROCESSO ALERGÊNICO DESENCADEADO POR ALBUMINAS 2S DE *Ricinus communis* (MAMONA)**

Rafaela O. Mayerhoffer<sup>1</sup>, Shayany P. Félix<sup>1</sup>, Renato A. Damatta<sup>2</sup>, Olga L. T. Machado<sup>1</sup>. (1) LQFPP e (2) LBCT – Centro de Biociências e Biotecnologia / UENF - Campos dos Goytacazes, RJ. [Olga@uenf.br](mailto:Olga@uenf.br)

#### **RESUMO**

O processo de sensibilização às proteínas alergênicas presentes nas sementes de mamona, se inicia com o primeiro contato do alérgeno, que ao penetrar no organismo encontra as chamadas células apresentadoras de antígenos, tais como os macrófagos. Essas células englobam a substância estranha, processando-a e apresentando-a em sua superfície, na forma de um complexo peptídeo-MHC II. Os linfócitos T reconhecem os fragmentos apresentados e passam a secretar substâncias que proporcionam a maturação dos linfócitos B, tornando-os células secretoras de anticorpos. Neste momento, ocorre o “switching” dos anticorpos IgM para a produção de anticorpos IgE. Moléculas de IgE se ligam a receptores presentes na superfície de mastócitos e basófilos. Em uma segunda exposição ao alérgeno, expressiva resposta alérgica é observada. O alérgeno se liga aos anticorpos IgE nos mastócitos e basófilos, promovendo a desgranulação e liberação de substâncias responsáveis pelo processo alergênico. Neste trabalho apresentamos o isolamento, e a caracterização de diversas isoformas de albuminas 2S, os principais alérgenos da torta. Foram investigadas alguns epitopos que foram apresentados por macrófagos no contexto MHC de classe II e bem como, quatro epitopos, IgE ligantes. Foi constatado também a existência de reações cruzadas entre alérgenos de mamona e alérgenos de fontes alimentares e inalantes.

#### **INTRODUÇÃO**

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de mamona. O uso desta euforbiácea é crescente com mais de 700 aplicações industriais. A mamona está sendo cogitada como a principal fonte para a produção de Biodiesel no Brasil e no exterior. Tal emprego sem dúvida acarretará em um aumento exagerado na produção da torta, o mais tradicional e importante subproduto da mamona após a extração do óleo. Do processamento industrial das bagas (sementes) de mamona, cada tonelada de óleo extraído corresponde a 1,28 tonelada de torta. O principal uso da torta de mamoneira é como adubo orgânico, que se constitui em um excelente fertilizante, possibilitando as inúmeras funções da matéria orgânica no solo. Apesar de apresentar um alto teor de proteínas, não se recomenda o uso da torta para ração pois é tóxica devido à presença da proteína ricina, e alergênica devido à existência do complexo alergênico, denominado nas décadas passadas de CB-1A (Castor-bean allergen) que é uma mistura de proteínas de baixo peso molecular e polissacarídeos. Hoje sabemos que o complexo



# I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

## Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

alergênico CB-1A representa cerca de 12,5% do peso da torta, como determinado pelo teste de precipitação de antígenos diluídos. Este complexo é formado por cerca de 20 isoformas de proteínas com massa molecular entre 10 e 14 kDa pertencentes à classe das albuminas 2S (Machado et al, 2003) . Duas isoformas alergênicas, Ric c 1 e Ric c 3 já se encontram seqüenciadas com características biológicas bem determinadas (Sharief & Li, 1982, Machado & Silva Jr., 1992, Silva Jr. et al 1996). Existem tratamentos para a desintoxicação da torta, no entanto, apesar da presença de proteínas alergênicas em sementes de mamona já ser conhecida há muitos anos, os tratamentos que são aplicados hoje para a torta de mamona se referem à desintoxicação mas são ineficientes para a desalergenização da torta. Os estudos que avaliem os problemas provocados pela manipulação da torta são insuficientes para a prevenção de doenças de hipersensibilidade. As proteínas alergênicas, as albuminas 2S, são resistentes à desnaturação térmica e química, podendo, mesmo após aos tratamentos de desintoxicação, desencadear alergia por contato bem como por inalação. Sabemos que com o uso crescente da mamona é mister que nos preocupemos com os agravantes relacionados ao processo alérgico. Assim, nosso grupo de pesquisa vem, há cerca de 15 anos, avaliando a natureza química destas proteínas, buscando elucidar os mecanismos que levam ao desencadeamento da alergia provocada elas. Para tanto, alguns projetos, listados a seguir, estão associados à nossa linha de pesquisa: 1) Isolamento e caracterização química e biológica de albuminas 2S de diversos cultivares de mamona; 2) Isolamento e caracterização de peptídeos apresentados por macrófagos no contexto MHC de classe II ; 3) Isolamento e caracterização de peptídeos apresentados por células dendríticas no contexto MHC de classe II ; 4) Identificação de epítomos ligantes de IgE e avaliação de reações cruzadas entre albuminas 2S de *R. communis* e extratos alergênicos de origem alimentar e inalantes; 5) Determinação da estrutura tridimensional de isoformas de albuminas 2S por estudos de RMN e por modelagem comparativa tomando como base à estrutura de isoforma, Ric c 3, já elucidada; 6) Desenvolvimento de técnicas imunoterápicas: hipossensibilização, bloqueio por ligações monocovalentes de peptídeos a IgE . 7) Desenvolvimento de uma droga que se associe a IgE no sítio de ligação dos epítomos predominantes identificados em diversos alérgenos, protegendo os mastócitos da desgranulação. 8) Avaliação das funções de defesa das albuminas 2S. Neste trabalho apresentamos alguns resultados obtidos até o momento.

### MATERIAL E MÉTODOS

Para o isolamento de albuminas 2S de diversos cultivares de mamona empregamos a metodologia desenvolvida por Thorpe e colaboradores (Thorpe, 1988) com as otimizações estabelecidas por nosso grupo de pesquisa. (Machado *et. al*, 2003). O conjunto de proteínas



# I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

## Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

alergênicas foi submetido ao fracionamento por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturante, em sistema preparativo. As frações isoladas foram submetidas ao fracionamento por cromatografia de fase reversa (C4-HPLC) (Machado *et. al*, 2003). Para a caracterização de epítomos lineares de albuminas 2S ligantes de IgE e avaliação de respostas cruzadas entre alérgenos de diversas fontes e albuminas 2s de *R. communis* avaliamos a desgranulação de mastócitos. Ratos Wistar, de aproximadamente 250 g cada, foram sacrificados por asfixia em CO<sub>2</sub> e a cavidade peritoneal foi lavada com 20 mL de DMEM contendo 12 u/mL de heparina. O lavado foi retirado da cavidade peritoneal e colocado em placa de Petri por 30 minutos a 37° C. Após esse tempo, 2/3 do meio de cultura foi retirado cuidadosamente da superfície com auxílio de pipeta Pasteur e descartado. O líquido remanescente contendo os mastócitos foi transferido para um tubo Falcon. A suspensão final de células foi dividida em alíquotas de 100 µL. Os Mastócitos obtidos foram tratados com 2 µL de soro antialbuminas 2S de mamona diluídos 1:100 e com 10 µL da amostra (1µg/mL) a serem testadas. Após incubação durante 1 hora em estufa a 37° C. As células (10 µL) foram coradas por 15 min com 10 µL solução aquosa contendo 0,1% de azul de toluidina, 10% de formaldeído e 1% de ácido acético, pH 2,8 para evidenciar a desgranulação. A contagem das células e a avaliação da desgranulação foram feitas em câmara de Neubauer através da observação em microscópio óptico Zeiss Axioplan. Controles adequados foram utilizados.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamos e elucidamos a estrutura primária de um dos principais alérgenos das sementes de mamona, o qual foi denominado Ric c 3, o qual é constituído por duas cadeias polipeptídicas, ligadas por pontes de enxofre, cujas seqüências em aminoácidos são para a cadeia leve: ESKGEREGSSSQ QCRQVRQRKDLSSCERYLRQSSS e, para a cadeia pesada QQQESQQLQQCCNQVKQVEDECQCEAIK YIAEDQIQGQLHGEESERVAQRAGEIVSSCGYRCMR. Esta proteína é sintetizada a partir de um mesmo precursor que produz também o isoalérgeno, Ric c 1. A complexidade das diversas isoformas purificadas por PAGE-Preparativa, bem como os tempos de retenção em coluna C4 e as estruturas primárias parciais destas proteínas são apresentados na tabela 1. Na tabela 2 apresentamos o percentual de desgranulação de mastócitos promovidos pelo conjunto de albuminas 2S, pelas isoformas principais e pelos peptídeos que foram identificados como epítomos ligantes de IgE. Na tabela 3 apresentamos o percentual de desgranulação de mastócitos, incubados com IgE antialbuminas 2S de *R. communis*, provocado por alérgenos de fontes alimentares e inalantes.



# I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

## Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

**Tabela 1.** Características de isoformas de albuminas 2S de *R. communis* isoladas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-Preparativa) e por cromatografia de fase reversa (C4-HPLC)

| Frações | $\mu_R$ (mobilidade relativa) | Tempo de retenção após C4-HPLC | Seqüência N-terminal parcial                           |
|---------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------|
| II      | 0,68                          | Muitas frações                 | N.D. (fração impura)                                   |
| III     | 0,54                          | 9                              | DSKEEREGQQ                                             |
| IV      | 0,52                          | 10                             | ESKGEREGSSSQQCR                                        |
| V       | 0,40                          | 10 e 12                        | ESKGEREGQQQQQCR                                        |
| VI      | 0,39                          | 10                             | GEREGSSSQQCR                                           |
| VII     | 0,27                          | 10 e 22                        | SKEESEGGQQXQQQQRQSQ<br>GEREGSSSQQCRQEVQRK <sup>3</sup> |
| VIII    | 0,26                          | 15                             | N.D. (N-terminal bloqueado)                            |
| IX      | 0,14                          | 5                              | N.D. (fração impura)                                   |
| X       | 0,14                          | 5                              | PSSQQGCRGQIQEQQLNR                                     |

**Tabela 2.** Identificação de Epitopos IgE ligantes – Peptídeos sintéticos presentes nas cadeias leves e pesadas de Ric c1 e de Ric c 3 que desgranularam mastócitos

| Amostras                  | % desgranulação             | % de desgranulação |
|---------------------------|-----------------------------|--------------------|
| Ric 1 Cadeia leve         | QEQQLNRQCQEYIK              | 65,0               |
| Ric 1 Cadeia pesada       | EGLRQAIEQQQSQQGQ            | 73,6               |
| Ric 3 Cadeia leve         | ESKGEREGSSSQQCR             | 63,7               |
| Ric 3 Cadeia leve         | QEVQRKDLSSCERYLR            | 69,6               |
| Ric 3 Cadeia pesada       | DECQCEAIKYIAEDQ             | 66,6               |
| Ric 3 Cadeia pesada       | LHGEESERVAQRAGE             | 53,9               |
| “pool” de Albumina 2S     | Ric c 1 + Ric c 3           | 73,0               |
| Controle de desgranulação | Mastócitos + soro pré-imune | 25,8               |

**Tabela 3.** Alérgenos que são reconhecidos por IgE antialbuminas 2s de *R. communis*

| Alérgenos alimentares | % de desgranulação | Alérgenos Inalantes | % de desgranulação |
|-----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Soja                  | 62,5               | Macela              | 65,9               |
| Peixes                | 57,6               | Tabaco              | 55,0               |
| Camarão               | 53,8               | Poeira domiciliar   | 51,4               |
| Amendoim              | 51,4               | Fungos do ar        | 46,7               |
| Leite                 | 47,0               | Gramínea            | 47,1               |
| Trigo                 | 46,7               | Glúten              | 43,7               |
| Milho                 | 46,0               |                     |                    |

## CONCLUSÃO

A imunoterapia padrão para a alergia do tipo I está baseada nas conseqüências da desgranulação dos mastócitos, consistindo o bloqueio da produção ou da liberação de mediadores ou em antagonizar as ações destes sobre as células alvos. Existem tratamentos destinados a reduzir a quantidade de IgE específica circulante no indivíduo como por ex. na terapia por hipossensibilização. Neste caso, extratos preparados diretamente das fontes de alérgenos são injetados por via subcutânea nos pacientes em quantidades pequenas porém crescentes, em intervalos determinados de tempo.



# I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

## Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

Entretanto, este tipo de tratamento apresenta um ponto fraco. Os extratos injetados contêm, além do alérgeno conhecido, outros potenciais alérgenos e componentes não alergênicos. Assim, tem se observado que pacientes alérgicos são freqüentemente co-sensibilizados contra diferentes alérgenos durante a hipossensibilização. A desgranulação dos mastócitos, por alérgenos de diversas fontes, mediadas por IgE antialbuminas 2S de *R. communis*, é indicativa de similaridades entre os epitopos destas fontes. Assim, nossos resultados podem contribuir para a seleção de alérgenos recombinantes carreando os principais epitopos de IgE focando a terapia de hipossensibilização. Isto preveniria os efeitos colaterais negativos durante a imunoterapia, pois evitaria a sensibilização *de novo*, contra componentes não desejáveis. Além disto, a identificação de epitopos de ligação de IgE das albuminas 2S de *R. communis* é uma das etapas iniciais para o desenvolvimento de uma droga capaz de ocupar este sítio, impedindo a ligação da proteína alergênica quando um indivíduo, já sensibilizado, entre novamente em contato com a mesma.

### REFERÊNCIAS

- MACHADO, O.L.T., SILVA, J.G. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 25, p. 567-582, 1992.
- MACHADO, O. L. T., MARCONDES-DE-SOUZA, J. A., SILVA, F. S., RIBEIRO, P. D., Verícimo, M. M., KANASHIRO, M., SILVA JR, J. G., SANTOS, M. F., COSTA-E-SILVA, M. C. **Allergologie**, v. 26, p.45 – 51, 2003.
- SILVA JR, J. G., MACHADO, O. L. T., IZUMI, C., PADOVAN, J. C., CHAIT, B. T., MIRZA, U. A., GREENE, L. J. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, p.10 – 18, 1996.
- THORPE, S. C., KEMENY, D. M., PANZANI, R. C., MC GURL, B., LORD, M. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 82, p. 67-72, 1988.
- Sharief, F.S., Li, S.S.L. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 14753-14759, 1982.
- VALENTA, R., STEINBERGER, P., DUCHÊNE, M. AND DIETRICH, K. **Immunology and Cell Biology**, v.74, p. 187-194, 1986.