



# O alérgeno imunodominante da tilápia geneticamente melhorada para aquacultura (*Oreochromis niloticus*) em quatro brasileiros alérgicos é uma proteína de 100 kDa susceptível à digestão péptica

*The immunodominant allergen of genetically improved farmed tilapia (Oreochromis niloticus) is a 100-kDa protein susceptible to pepsin digestion in four fish-allergic Brazilian patients*

Celso Eduardo Olivier, MD, PhD<sup>1</sup>; Regiane Patussi dos Santos Lima, BSc<sup>1</sup>; Daiana Guedes Pinto Argentão, BSc<sup>1</sup>; Mariana Dias da Silva, PHARM<sup>1</sup>; Raquel Acácia Pereira Gonçalves dos Santos, RN<sup>1</sup>; Jaison Castro Oliveira, BSc<sup>2</sup>; Priscila Cristina Vaz Bortolozzo, BSc, MSc<sup>2</sup>

## RESUMO

A caracterização dos alérgenos de peixes brasileiros ainda é deficiente. Este estudo foi conduzido com quatro indivíduos brasileiros que apresentaram reações imediatas após a ingestão de tilápia. A natureza mediada por IgE da hipersensibilidade foi demonstrada por testes cutâneos e por *immunoblotting*. Uma proteína ainda não caracterizada de 100 kDa foi identificada pelo *immunoblotting* IgE como o alérgeno do extrato natural não digerido da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) geneticamente melhorada para aquacultura. Esta proteína foi susceptível à atividade péptica como demonstrado por SDS-PAGE, que mostrou uma banda única entre 12 e 19 kDa após a digestão péptica. Os testes cutâneos com o extrato digerido de tilápia não demonstraram nenhuma reação, assim como o *immunoblotting* IgE não demarcou nenhuma banda na corrida eletroforética do extrato digerido.

**Descritores:** Hipersensibilidade alimentar, imunoglobulina E, tilápia, *immunoblotting*, pepsina A, criança.

## ABSTRACT

Characterization of Brazilian fish allergens is still poor. This study was conducted with four Brazilian subjects who presented immediate reactions following tilapia ingestion. The IgE-mediated nature of their hypersensitivity was demonstrated by skin testing as well by IgE immunoblotting. A yet uncharacterized protein with approximately 100 kDa was identified by IgE immunoblotting as the allergen of the undigested natural extract of the genetically improved farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (GIFT). This protein was susceptible to pepsin activity, as demonstrated by SDS-PAGE, which showed a single protein band around 12 to 19 kDa after pepsin digestion. Skin testing with the digested GIFT extract did not demonstrate any reaction, and IgE immunoblotting did not stain any bands at the electrophoretic lane.

**Keywords:** Food hypersensitivity, immunoglobulin E, tilapia, immunoblotting, pepsin A, child.

<sup>1</sup> Instituto Alergoimuno de Americana, Americana, SP.

<sup>2</sup> Faculdade Anhanguera de Santa Bárbara, Santa Bárbara D'Oeste, SP.

## Correspondência para:

Celso Eduardo Olivier  
E-mail: celso@docsystems.med.br

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Submetido em: 29/12/2013,  
aceito em: 29/11/2016.

Reações de hipersensibilidade a alimentos, e em particular, a proteínas de peixes, são um problema médico universal<sup>1</sup>. Reações alérgicas a peixes podem ser produzidas após a ingestão, contato ou inalação de vapores por indivíduos sensibilizados que podem desenvolver urticária, angioedema, asma, dispepsia, perda de consciência e/ou choque anafilático. A parvalbumina, uma pequena proteína ligante de cálcio,

abundante na musculatura branca de vertebrados de sangue frio, representa o principal alérgeno de peixes marinhos devido a sua reatividade cruzada entre espécies e resistência ao aquecimento e digestão<sup>2</sup>. Além da parvalbumina, que age como um pan-alérgeno, diversas outras proteínas de peixes podem desencadear reações mediadas por IgE e reações não IgE-mediadas. A maioria dos estudos publicados sobre alergia a peixes

focaliza sua atenção sobre espécies marinhas, mas nos últimos anos, a alergia a peixes de água doce tem sido relatada mais frequentemente<sup>3</sup>. À medida que a demanda por carne de peixes tem aumentado mundialmente, as fontes naturais vêm sendo depletadas pela superexploração. Isto tem sido um incentivo para a aquacultura, que vem nos últimos anos aumentando progressivamente a sua contribuição para o suprimento de carne de peixe para a alimentação humana<sup>4</sup>. Neste propósito, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi introduzida no Nordeste brasileiro em 1971, trazida da Costa do Marfim<sup>5</sup>. A tilápia do Nilo adaptou-se bem às condições climáticas brasileiras e sua reprodução prolífica e alta resistência contribuíram para sua disseminação para outras regiões. Em 1988 o *WorldFish Center* das Filipinas e o da Noruega desenvolveram uma cepa geneticamente melhorada da tilápia do Nilo para aquacultura (GIFT)<sup>4</sup>. Manipulação genética, reversão sexual e técnicas de seleção foram usadas para modificar as cepas nativas de maneira a torná-las mais produtivas<sup>6,7</sup>. Em 2005 a cepa GIFT foi finalmente introduzida no Brasil e adotada por muitos piscicultores<sup>8</sup>. Mais recentemente, alergia à tilápia do Nilo não causada por parvalbumina foi descrita, diversamente das espécies marinhas<sup>9</sup>. A caracterização dos alérgenos da tilápia de Moçambique também demonstrou que a parvalbumina não é um alérgeno relevante para a tilápia<sup>10</sup>. Até o momento, o alérgeno da tilápia mais bem estudado é a tropomiosina de 33 kDa da tilápia de Moçambique (Ore m 4)<sup>11</sup>.

O presente trabalho descreve um grupo de quatro indivíduos brasileiros que desenvolveram alergia oral e/ou urticária após a ingestão de tilápia, assim como o estudo de sua imunoreatividade contra as proteínas da tilápia através de testes cutâneos, e SDS-PAGE e *immunoblotting* IgE.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Anhanguera e registrado na Plataforma Brasil, CAAE 12361213.1.0000.5372 e conduzido conforme os princípios da declaração de Helsinque após obtenção de consentimento informado. Os dados dos pacientes foram mantidos em confidencialidade. Não foram utilizadas drogas experimentais. Não houve nenhum conflito de interesses potencial ou declarado.

## RELATO DE CASOS

*Paciente n° 1:* sexo feminino, 31 anos. Apresentou nos dois meses anteriores ao exame dois episódios de urticária 30 minutos após a ingestão de tilápia. Referiu estar habituada a comer tilápia e outros peixes, sem apresentar sintomas previamente.

*Paciente n° 2:* sexo feminino, 6 anos. Apresentou edema labial e urticária 10 minutos após a ingestão de

tilápia. Seus pais não se lembravam de que a criança houvesse comido tilápia anteriormente, mas havia comido outras espécies de peixes sem desenvolver sintomas.

*Paciente n° 3:* sexo feminino, 8 anos. Apresentou edema de lábios 20 minutos após a ingestão de tilápia. Seus pais referiram que ela havia ingerido tilápia uma ou duas vezes, assim como outras espécies de peixes, sem apresentar sintomas previamente.

*Paciente n° 4:* sexo feminino, 31 anos. Apresentou prurido e edema de lábios imediatamente após contato com tilápia na boca, interrompendo a ingestão. Referiu que não ingeria tilápia habitualmente, mas fazia uso de outros peixes sem apresentar sintomas.

## MÉTODOS

### *Preparação dos extratos e digestão péptica*

Os extratos foram preparados a partir de exemplares da cepa GIFT doadas por um piscicultor da região. Os extratos foram preparados por extração em solução de Coca sob agitação contínua por 24 horas a 4 °C. Após a centrifugação, a concentração de proteína do sobrenadante foi determinada pelo método de Hartree, ajustada para 1 mg/mL e armazenada a -20 °C. Para a digestão péptica, as preparações de proteínas foram incubadas a 37 °C com 0,87 g/L de pepsina (Sigma, St Louis, Mo, USA) em pH 2 sob agitação contínua. A reação enzimática foi finalizada por neutralização do pH e resfriamento em gelo após 1 minuto de incubação. A digestão da proteína foi avaliada através de eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida pelo método de Lam-meli (SDS-PAGE 5%T/20%C) e coloração com azul de Coomassie, como descrito previamente<sup>12</sup>.

### *Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata*

Não estando em uso de nenhuma medicação por duas semanas, os pacientes foram submetidos a testes cutâneos de puntura (*skin prick test*) com os extratos de tilápia não digerido, digerido e controles de histamina (1 mg/mL) e diluente.

### *Immunoblotting*

As amostras de soro foram analisadas após eletroforese em gel de gradiente (5%T/20%C) de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condições redutoras em aparelho Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad, CA, USA). Alíquotas de 5 µL dos extratos não digeridos e digeridos preparados em tampão contendo SDS (2%) e mercaptoethanol (5%) foram aquecidos por 10 minutos a 96 °C e aplicados em cada poço. Um padrão de comparação de pesos moleculares pré-corado de 10-170 kDa (PageRulerH,

Fermentas, Hanover, MD, USA) foi empregado para identificar os pesos moleculares aproximados. Após a corrida eletroforética vertical, as proteínas foram transferidas por eletroforese horizontal para membranas de nitrocelulose com poros de 0,45 mm (Bio-Rad, CA, USA) com auxílio do Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, CA, USA). As membranas foram incubadas por 10 horas a 4 °C e agitação pendular suave em 3 mL de solução de fosfato tamponada (PBS), pH 7,0 contendo 3 µL do soro de cada paciente individualmente, seguido por 3 lavagens em PBST (PBS adicionado de 0,05% Tween-20). A seguir, as membranas foram incubadas em agitação pendular suave por 2 horas com IgG de cabra policlonal anti-IgE humano (15 µg em 3 mL PBS), lavadas 3 vezes com PBST e incubadas com IgG de coelhos anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase do rábano por 2 horas. Após 3 lavagens em PBST, a atividade da peroxidase foi estimulada incubando as membranas em 10 mL de PBS contendo 0,05% de diaminobenzidina, seguida por adição de 50 µL de solução reagente (CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e NiSO<sub>4</sub>) e 20 µL de peróxido de hidrogênio 30% vol. (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Quando a impregnação e desenvolvimento da coloração se completaram, as membranas foram lavadas em água destilada e secadas. Imagens do gel e das membranas de nitrocelulose foram escaneadas em escala de cinza e a densitometria relativa das bandas foi analisada usando o programa ImageJ (Windows version 1.44 NIH ImageJ, <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) pela mensuração da densidade óptica média (OD) das bandas após inversão do brilho da imagem. A densidade óptica ajustada (AOD) foi calculada após a correção do *background* por subtração da OD da banda demarcada da OD de área similar lida na proximidade da banda que não demonstrou nenhum sinal de coloração.

## RESULTADOS

### Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata

Todos os indivíduos demonstraram testes cutâneos de hipersensibilidade imediata positivos para o controle de histamina e para o extrato de tilápia GIFT não digerido (Tabela 1). Não houve reações para o extrato digerido ou para o diluente (resultados não mostrados).

### Eletroforese em SDS-PAGE

A análise do gel de gradiente corado com azul de Coomassie demonstrou a distribuição das proteínas do extrato natural não digerido entre 10 faixas de pesos moleculares: 100 kDa, 64 kDa, 52 kDa, 44 kDa, 40 kDa, 34 kDa, 30 kDa, 19 kDa, 15 kDa e 12 kDa. Este padrão desapareceu após a digestão com pepsina que mostrou no gel corado com azul de Coomassie uma única banda em torno de 12 a 19 kDa (Figura 1).

### Immunoblotting

Os soros dos quatro pacientes marcaram uma única banda de 100 kDa na corrida eletroforética do extrato natural não digerido de tilápia. Não houve nenhuma marcação na corrida eletroforética do extrato digerido. As densidades ópticas ajustadas da banda de 100 kDa variaram de 7 a 24 (Tabela 1). Como não houve nenhuma marcação na corrida eletroforética do extrato digerido, todas as leituras ópticas ajustadas foram iguais a zero. A Figura 1 mostra lado a lado, da esquerda para a direita, o padrão de peso molecular (L), a distribuição eletroforética no gel de gradiente corado com azul de Coomassie das proteínas do

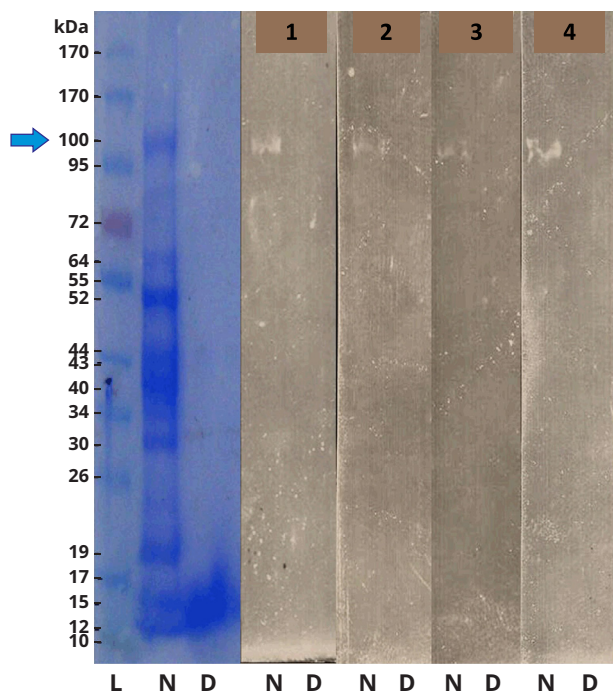
**Tabela 1 -** Características clínicas e resultados de testes cutâneos em quatro pacientes com reações imediatas à ingestão de tilápia

| Paciente | Idade (em anos) | Sexo | Sintomas clínicos                   | Teste cutâneo de puntura (mm) <sup>a</sup> | Densidade óptica ajustada <sup>b</sup> |
|----------|-----------------|------|-------------------------------------|--|--|
| 1        | 31              | F    | Urticária                           | 12   | 24                                     |
| 2        | 6               | F    | Urticária /Síndrome da alergia oral | 9  | 7                                      |
| 3        | 8               | F    | Urticária                           | 9  | 9                                      |
| 4        | 34              | F    | Urticária /Síndrome da alergia oral | 10   | 18                                     |

<sup>a</sup> Medida do maior diâmetro da pápula, em mm, após teste de puntura com o extrato natural não digerido da cepa geneticamente modificada da tilápia do Nilo para aquacultura (GIFT).

<sup>b</sup> Densidade óptica ajustada da banda de 100 kDa identificada após immunoblotting IgE contra o extrato não digerido da cepa GIFT.

extrato natural não digerido (N), do extrato digerido (D) e as membranas de nitrocelulose dos quatro pacientes após o *immunoblotting* revelado com anti-IgE e peroxidase.



L = padrão de massas moleculares pré-corado (kDa); N = corrida eletroforética do extrato natural não digerido da cepa de tilápia do Nilo geneticamente melhorada para aquacultura (GIFT); D = corrida eletroforética do extrato natural digerido da cepa GIFT.

**Figura 1** - Gel de gradiente de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado em azul de Coomassie (à esquerda) e as 4 membranas de nitrocelulose reveladas após *immunoblotting* IgE com soro dos quatro pacientes (à direita)

## DISCUSSÃO

A caracterização dos antígenos alimentares é uma etapa essencial na condução do tratamento de pacientes com alergia alimentar e para o planejamento de estratégias de indução de tolerância. Os alérgenos alimentares podem ser classificados de acordo com a sua natureza em duas classes. Os alérgenos de classe 1 são resistentes à digestão gástrica e podem sensibilizar após a absorção intestinal, como é o exemplo da beta-lactoglobulina bovina (Bos d 5). Os alérgenos de classe 2 são suscetíveis à digestão gástrica e sensibilizam por contato direto com a mucosa oral/nasal e/ou por reatividade cruzada, como por exemplo, as proteínas dos polens e das frutas<sup>13</sup>. Os alérgenos de classe 1 estão

geralmente associados com manifestações sistêmicas como urticária, asma ou anafilaxia. Os alérgenos de classe 2 estão geralmente associados com manifestações locais como a síndrome da alergia oral ou a rinite, mas podem produzir ocasionalmente manifestações sistêmicas quando a digestão gástrica está por alguma razão comprometida (uso de antiácidos, por exemplo). Os quatro pacientes apresentados aqui são um exemplo típico de sensibilização por um alérgeno de classe 2. O aparecimento "ocasional" de reações adversas sugere que a digestão gástrica das proteínas da tilápia protege contra o aparecimento de reações alérgicas. A pepsina digere até 20% das ligações amídicas pela clivagem preferencial entre os resíduos aromáticos dos aminoácidos. A digestão péptica de um alérgeno geralmente destruirá seus epítomos conformacionais (dependentes da estrutura secundária, terciária e quaternária), diminuindo sua alergenicidade. Uma vez que a digestão péptica é incompleta, os peptídeos resultantes podem preservar os epítomos lineares responsáveis pelo reconhecimento nos receptores de células T (ou mesmo em alguns receptores de linfócitos B). A preservação dos epítomos conformacionais de um extrato de alérgenos é altamente desejável quando este extrato é usado com propósitos diagnósticos. Entretanto, a preservação dos epítomos conformacionais de um extrato de alérgenos não é tão desejável quando este extrato é utilizado com propósitos terapêuticos. De fato, para a indução de um repertório de células T regulatórias, a célula apresentadora de antígenos apresenta para a célula T virgem somente os epítomos lineares resultantes da digestão intracelular do alérgeno. Estes epítomos lineares não correspondem necessariamente ao mesmo epítomo conformacional imunorreativo, mas podem ter sido retirados de outra parte da proteína. Atualmente, estratégias de indução de tolerância incluem a imunoterapia alérgeno-específica e também a imunoterapia "epítomo de célula T específico" (peptídica)<sup>14</sup>. Neste sentido, a estratégia de indução de tolerância para o tratamento da alergia a peixes também procura por proteínas modificadas de forma a serem menos alergênicas que suas contrapartes originais, mas que preservem a imunorreatividade para as células T (epítomos lineares)<sup>2</sup>. O uso de tecnologia recombinante abre novas perspectivas para o tratamento de alérgenos resistentes à digestão como a parvalbumina, mas pode não ser tão necessária para as proteínas digeríveis, que podem ser convertidas em peptídeos tolerogênicos pela simples digestão com pepsina.

A carne de peixe é um dos alérgenos mais comuns. Entretanto, enquanto diversos pesquisadores estudam os alérgenos de peixes marinhos consumidos globalmente, a caracterização dos alérgenos dos peixes brasileiros de água-doce ainda está inexplorada. A cepa GIFT de tilápia está se disseminando rapidamente por nosso país e tornando-se uma fonte importante de carne

de peixe. O aparecimento de indivíduos alérgicos às suas proteínas específicas é de certa forma esperado. Pesquisadores estão trabalhando no desenvolvimento de estratégias de indução de tolerância para a alergia a peixes marinhos; entretanto, possíveis diferenças com os alérgenos de peixes brasileiros podem levar à falta de eficácia com o uso de imunoterapia desenvolvida em outros países nos pacientes brasileiros. A caracterização dos alérgenos de peixes brasileiros é o primeiro passo na pesquisa de estratégias de indução de tolerância adaptadas ao nosso país.

## REFERÊNCIAS

1. Sharp MF, Lopata AL. Fish Allergy: in Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014;46:258-71.
2. Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Linhart B, Verdino P, Keller W, Schulmeister U, et al. A recombinant hypoallergenic parvalbumin mutant for immunotherapy of IgE-mediated fish allergy. *J Immunol*. 2007;178:6290-6.
3. Liu R, Krishnan HB, Xue W, Liu C. Characterization of allergens isolated from the freshwater fish blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *J Agric Food Chem*. 2011;59:458-63.
4. Gupta MV, Acosta BO. From drawing board to dining table: the success story of the GIFT project. *NAGA - Worldfish Center Quarterly*. 2004;27:4-14.
5. Oliveira SN, Ribeiro RP, Lopera NM, Candioto FB, Resende EKd, Legat AP. Genetic characterization of three Nile tilapia (GIFT strain) generations using the RAPD marker. *Acta Scientiarum - Animal Sciences*. 2011;33:207-12.
6. Li S-F, He X-J, Hu G-C, Cai W-Q, Deng X-W, Zhou P-Y. Improving growth performance and caudal fin stripe pattern in selected F6–F8 generations of GIFT Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using mass selection. *Aquaculture Research*. 2006;37:1165-71.
7. Phelps RP, Pompma TJ. Sex reversal of tilapia In: *Tilapia Aquaculture in the Americas*. Vol 2. Baton Rouge, Louisiana, United States: The World Aquaculture Society; 2000 p. 34-59.
8. Lupchinski-Junior E, Vargas L, Povh JA, Ribeiro RP, Mangolin CA, Barrero NML. Variability evaluation of G0 and F1 generations of GIFT Nile tilapia strain (*Oreochromis niloticus*) by RAPD. *Acta Scientiarum - Animal Sciences*. 2008;30:233-40.
9. Ebo DG, Kuehn A, Bridts CH, Hilger C, Hentges F, Stevens WJ. Monosensitivity to pangasius and tilapia caused by allergens other than parvalbumin. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20:84-8.
10. Liu R, Yang E, Liu C, Xue W. Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) allergens characterized by ELISA, SDS-PAGE, 2D gels, Western blotting and MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Food Sci Nutr*. 2012;63:259-66.
11. Liu R, Holck AL, Yang E, Liu C, Xue W. Tropomyosin from tilapia (*Oreochromis mossambicus*) as an allergen. *Clin Exp Allergy*. 2012;43:365-77.
12. Olivier CE, Lorena SLS, Pavan CR, Santos RAPG, Lima RPS, Pinto DG, et al. Is it just lactose intolerance? *Allergy Asthma Proc*. 2012;33:432-6.
13. Olivier CE. *Food Allergy*. *J Allergy Ther*. 2013;S3:004. doi: 10.4172/2155-6121.S3-004.
14. Pickl WF. The value of identifying major T cell epitopes of clinically important allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;160:4-6.