



Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Identificação e caracterização de alergénios, mediante técnicas de extração e separação proteica, e western blotting

Dissertação de Mestrado

Andreia Grilo Marques

Nº 7310

Orientador:

Prof. Dr. Luís Martins

Évora, 2012



Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Identificação e caracterização de alergénios, mediante técnicas de extração e separação proteica, e western blotting

Dissertação de Mestrado

Andreia Grilo Marques

7310

Orientador:

Prof. Dr. Luís Martins

Évora, 2012

“Há uma razão por detrás de tudo na natureza”

Aristóteles

Agradecimentos

Desejo, deste modo, expressar os meus sinceros agradecimentos às várias pessoas sem as quais a realização deste trabalho seria impossível.

Um muito obrigado ao Professor Doutor Luís Martins por me ter orientado nesta dissertação, pelo seu apoio e pela sua disponibilidade na resolução de todos os problemas.

À Professora Luísa por toda a ajuda e boa disposição.

Quero, também, agradecer a outros amigos que mesmo não estando presentes diariamente estiveram a torcer por mim, principalmente à Rita R., à Rita Oliveira, à Sofia e a Rita Nabiça.

Um muito obrigado especial aos meus pais e à minha irmã por todo o carinho e apoio e, também por me terem permitido chegar até aqui.

Um muito obrigado ao Diogo por todo o apoio incondicional.

Identificação e caracterização de alergénios, mediante técnicas de extração e separação proteica, e western blotting.

Resumo

O recurso à imunoterapia específica tem-se revelado muito eficaz no controlo das alergias em medicina veterinária, devendo esta ser o mais direcionada possível.

A identificação do repertório alergénico molecular de cada indivíduo possibilitará, futuramente, o recurso a uma imunoterapia molecular específica com previsível aumento da taxa de eficácia clínica. Neste trabalho pretendeu-se otimizar os métodos de obtenção dos imunoblots de ácaro (*Dermatophagoides pteronyssinus*) e gramíneas (*Dactylis glomerata* e *Phleum pratense*).

Foram selecionados e analisados vários soros de cães da região de Évora e de Lugo, Espanha, que apresentavam sintomatologia sazonal relacionada com a sensibilização aos ácaros e às gramíneas em estudo.

Observaram-se várias semelhanças entre os alergogramas canino e humano e os estudos apontam para uma tendência em complexar o espectrotipo mesmo após uma imunoterapia bem-sucedida, sugerindo uma ausência de correlação absoluta entre sensibilização e alergia.

Identification and characterization of allergens using protein extraction and separation techniques, and western blotting..

Abstract

The use of specific immunotherapy has shown to be very useful for allergy control in veterinary medicine and it should be prescribed as directed as possible.

The identification of the molecular allergen repertoire of each individual will allow, in the future, the use of a specific molecular immunotherapy with a predictable increase in clinical efficacy. The aim of this work was to optimize the immunoblotting methods for mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and grass pollens (*Dactylis glomerata* and *Phleum pratense*).

We selected and analyzed several dog's sera from the region of Évora and Lugo, Spain, which presented seasonal symptoms related with sensitization and allergy to mite and grass pollens.

We observed several similarities between canine and human alergograms and a tendency to an increase in spectrotpe complexity, even after successful immunotherapy, suggesting an absence of absolute correlation between sensitization and allergy.

Abreviaturas

IgE – imunoglobulina E

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

IL-4 – interleucina do tipo 4

IL-5 – interleucina do tipo 5

kDa – kiloDalton

M – molar

pI – ponto isoelétrico

PM – peso molecular

TNF – fator de necrose tumoral

μL – microlitros

V – volts

W – watts

Este trabalho foi parcialmente comunicado em:

Martins L, Marques A, Martins A, Bento O. (2011). “The *Dactylis glomerata* (Grass Pollen) Allergen Repertoire for Dogs”. Poster nr 22. 2nd International Congress of the Southern European Allergy Societies – Lisbon, 31st March to 2nd April. Proceedings em formato digital. pp 9. (www.seas2011.com)

Índice

Resumo	v
Abstract.....	vi
Abreviaturas.....	vii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xi
1. Fundamento Teórico	1
A Alergia.....	2
Reações de Hipersensibilidade	3
Os alérgenos e suas principais características	6
2. Problemática.....	13
3. Objetivos científicos.....	15
4. Materiais e Métodos	17
Preparação dos extratos para a separação proteica.	18
Separação das proteínas dos extratos alérgenos.....	18
Separação por IEF em gel de poliacrilamida a 5%	25
Produção de géis de poliacrilamida a 12% para SDS PAGE.....	25
Separação por SDS PAGE em gel de poliacrilamida a 12%	28
Separação bidimensional em gel de poliacrilamida a 12%	29
Transferência das proteínas separadas em gel para membranas de PVDF.....	30
Verificação da transferência	32
Visualização da separação proteica – Coloração e Preservação dos géis de IEF e SDS PAGE (uni- ou 1D e bidimensional ou 2D).....	32
Detecção dos alérgenos – Immunoblotting ou Western Blotting	34
5. Resultados e Discussão	37
Padronização das condições de separação proteica por IEF.....	39

Padronização das condições de separação proteica por SDS PAGE (uni- e bidimensional)	40
Padronização das condições de Western Blotting ou Immunoblotting	40
Espectrotipos obtidos através da separação por IEF de gramíneas	41
Espectrotipo obtido através da separação por IEF do ácaro.	45
Espectrotipos obtidos através da separação SDS PAGE unidimensional de gramíneas	48
Espectrotipos obtidos através da separação SDS PAGE unidimensional do ácaro.	51
Espectrotipos obtidos através da separação SDS PAGE bidimensional de gramíneas	53
6. Conclusões	55
7. Perspectivas Futuras	57
8. Bibliografia.....	60
9. Anexos.....	68

Índice de Figuras

Figura 1: Reações de hipersensibilidade (Adaptado de Marc & Olson , 2009)	4
Figura 2: <i>Dactylis glomerata</i> (Adaptado de www.flora-on.pt)	8
Figura 3: <i>Phleum pratense</i> (Adaptado de www.flora-on.pt).....	9
Figura 4: <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Adaptado de www.phadia.com).....	11
Figura 5 - Esquema do Gelbond para separação por IEF de extrato de ácaro e de gramínea. + e -: lados, respetivamente, ânodo e cátodo, com as linhas horizontais internas adjacentes, de aplicação dos papéis eléctodos. pI – linha de aplicação do marcador de ponto isoeletrico. X e Y – linhas de colocação do aplicador de amostra. AC – faixas a corar pelo Azul de Coomassie. Blot – faixas a transferir por eletrotransferência. Ag – faixa a corar pela prata. As linhas verticais designam os locais de corte para tiras que posteriormente serão sujeitas a 2D.	19
Figura 6 - Aplicação do Gelbond de suporte (Adaptado de Westermeier, 1993)	19
Figura 7 - Enchimento da cassete para formação do gel de poliacrilamida a 5% (Adaptado de Westermeier, 1993).....	20
Figura 8 - Re-hidratação do gel de poliacrilamida a 5% (Adaptado de Westermeier, 1993).....	21
Figura 9 - Remoção do excesso de solução de re-hidratação (Adaptado de Westermeier, 1993).	22
Figura 10 - Esquema do Gelbond para separação por SDS PAGE de extrato de ácaro e de gramínea. + e -: lados, respetivamente, ânodo e cátodo, com as linhas horizontais internas adjacentes, de aplicação dos papéis eléctodos. PM – linha de aplicação do marcador de peso	

molecular. X e Y – linhas de colocação do aplicador de amostra. AC – faixas a corar pelo Azul de Coomassie. Blot – faixas a transferir por eletrotransferência.....	26
Figura 11 - Esquema de uma placa de "casting" dos géis eléctrodos, para eletroforese horizontal.	27
Figura 12: Esquema para escolha do melhor local de aplicação da amostra.....	39
Figura 13: Western Blotting a partir da separação por IEF de <i>Dactylis glomerata</i> e <i>Phleum pratense</i> revelado com anti-HRP. TC = tinta-da-china; B = branco; números representam o número de pacientes analisados.	42
Figura 14 – Western Blotting a partir da separação por IEF de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> revelado com anti- HRP. AC = Azul de Coomassie; TC = tinta da china; B = branco.....	46
Figura 15 – Western Blotting a partir da separação por SDS PAGE de <i>Dactylis glomerata</i> . Os números representam os pacientes, sendo que o soro do paciente 6 foi analisado antes (6A) e após ser sujeito a imunoterapia específica (6D). TC = coloração pela tinta da china; B = branco.	48
Figura 16 - Western Blotting a partir da separação por SDS PAGE de <i>Phleum pratense</i> . AC = Azul de Coomassie; TC = tinta da china; 1 a 14 indivíduos estudados.	50
Figura 17 - Western Blotting a partir da separação por SDS PAGE unidimensional de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> . TC – tinta-da-china; B – branco.	51
Figura 18 - Immunoblotting da separação SDS PAGE bidimensional de <i>Dactylis glomerata</i> ...	53
Figura 19 - Immunoblotting da separação SDS PAGE bidimensional de <i>Phleum pratense</i>	54
Figura 20 - Immunoblotting da separação SDS PAGE bidimensional de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	54

Índice de Tabelas

Tabela I - Tipos de Hipersensibilidade (Zabriskie, 2009; Kindt, 2007; Brostoff & Hall, 1998; Marc & Olson, 2009).....	3
Tabela II: Taxonomia da <i>Dactylis glomerata</i> (Adaptado de www.phadia.com).....	7
Tabela III: Alergénios identificados na <i>Dactylis glomerata</i> (Adaptado de www.allergen.org ; www.uniprot.org)	8
Tabela IV: Taxonomia da <i>Phleum pratense</i> (Adaptado de www.phadia.com).....	9
Tabela V: Alergénios identificados no <i>Phleum pratense</i> (Adaptado de www.allergen.org ; www.uniprot.org)	10
Tabela VI: Taxonomia de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Adaptado de www.phadia.com).....	11
Tabela VII: Alergénios identificados no <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Adaptado de www.allergen.org ; www.uniprot.org)	12
Tabela VIII - Condições de corrente utilizada para a separação proteica das gramíneas.	23
Tabela IX - Condições de corrente utilizada para a separação proteica do ácaro.	24

Tabela X - Alergénios identificados a partir da IEF de <i>Dactylis glomerata</i>	43
Tabela XI - Alergénios identificados a partir da IEF de <i>Phleum pratense</i>	44
Tabela XII Alergénios identificados a partir da IEF do ácaro.....	47
Tabela XIII Alergénios identificados a partir da separação SDS PAGE de <i>Dactylis glomerata</i>	49
Tabela XIV Alergénios reconhecidos no imunoblotting da separação por SDS PAGE unidimensional de <i>Phleum pratense</i>	50
Tabela XVI Alergénios reconhecidos da separação SDS PAGE unidimensional de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	52

1. Fundamento Teórico

A Alergia...

A palavra “alergia” foi utilizada pela primeira vez por von Pirquet em 1906 ao verificar que os antigénios induziam mudanças na reatividade, tanto da imunidade inata como nas reações de hipersensibilidade (Kay, 2001). Atualmente, este termo serve para designar uma reação exagerada do sistema imunitário contra os antigénios presentes no meio ambiente (Barata, 2011).

Existe uma grande diversidade de substâncias capazes de gerar reações alérgicas, sendo o tipo de resposta dependente de uma sensibilização prévia seguida de um novo contacto com a substância sensibilizante. A capacidade de uma substância gerar sensibilização depende de fatores genéticos e ambientais, tais como a sua disponibilidade no meio ambiente e a da sua concentração (Brostoff & Hall, 1998).

Alguns seres vivos respondem de uma forma exagerada produzindo imunoglobulinas (Ig) E em excesso, aquando do contacto com alguns antigénios. Aos antigénios capazes de gerar este tipo de resposta imunitária dá-se o nome de alérgenos, e este tipo de resposta é denominado sensibilização e pode conduzir a reação alérgica. Outro conceito de atopia consiste, então, numa pré-disposição hereditária para produzir anticorpos IgE contra alérgenos (Johansson *et al*, 2001). Muitas vezes estes alérgenos são partículas existentes no meio ambiente e para as quais a maioria dos seres vivos não produz qualquer reação (Kay, 2001; Barata, 2011; Bousquet & Michel, 1995; Cromwell, 1997).

A estrutura antigénica capaz de induzir a produção aumentada de IgE é difícil de identificar uma vez que os indivíduos são expostos a um grande número de fontes alérgicas contendo várias moléculas homólogas, como no caso de diferentes espécies de gramíneas (Ferreira *et al.*, 2004), de ácaros, de moluscos ou de crustáceos (Reese *et al.*, 1999).

Quando ocorre o segundo contacto com o antigénio, o organismo de alguns seres vivos desencadeia uma resposta imunológica exagerada que pode causar danos nos tecidos. Este tipo de resposta, por parte do organismo, é denominada de hipersensibilidade. Ligadas ao estudo das alergias estão a hipersensibilidade dos tipos I e IV. O tipo I, denominado hipersensibilidade imediata, ocorrendo pouco minutos após o contacto com o alérgeno, enquanto o tipo IV, denominado hipersensibilidade retardada, surge 48 a 72h após o contacto com o alérgeno e se encontra frequentemente associado à alergia por contacto (Rabson *et al*, 2005).

Reações de Hipersensibilidade

As reações de hipersensibilidade são caracterizadas por uma alteração na reatividade nas quais o organismo produz uma resposta imunológica exagerada, podendo levar à danificação dos tecidos. Este tipo de reação acontece, geralmente, durante o segundo ou posteriores contactos com o antígeno indutor, sensibilizante, não havendo, em regra, qualquer manifestação durante o primeiro contato. (Abbas & Lichtman, 2005; Paul, 2008; Sohi & Warner, 2008).

Peter Gell e Robert Coombs, em 1963, classificaram as reações de hipersensibilidade em quatro tipos (I, II, III e IV) (Tabela I, Fig. 1), sendo cada um deles caracterizado pelas ações biológicas ocorridas. Clinicamente, é, por vezes, difícil distinguir os quatro tipos de hipersensibilidade, pois estes podem não ocorrer isoladamente uns dos outros. A mediação por anticorpos é comum à hipersensibilidade dos tipos I, II e III, a mediação por células T e macrófagos caracteriza a do tipo IV (Brostoff & Hall, 1998).

Tabela I - Tipos de Hipersensibilidade (Zabriskie, 2009; Kindt, 2007; Brostoff & Hall, 1998; Marc & Olson, 2009).

Tipos de Hipersensibilidade	Imunopatologia	Mecanismos de ação
Tipo I: hipersensibilidade imediata	Produção aumentada de IgE	Após ligação da IgE ao seu recetor de alta afinidade, os mastócitos e os basófilos captam os alérgenos e são ativados, libertando agentes vasoativos (histamina e outros mediadores lipídicos).
Tipo II: mediada por células ou hipersensibilidade citotóxica	Produção de IgG e IgM	Os anticorpos IgG e IgM ligam-se aos antígenos formando complexos que visam a ativação da via do complemento. São gerados mediadores de inflamação (células B e anticorpos) e

Tipo III: mediada por imunocomplexos.

Produção de imunocomplexos antígeno-anticorpo

citocinas que levam a lise e morte celular.

A deposição dos complexos em vários tecidos ativa o complemento e a resposta inflamatória mediada por neutrófilos.

Tipo IV: hipersensibilidade tardia / retardada

Produção de citocinas pelas células T_H

As células T_H sensibilizadas libertam citocinas que activam os macrófagos e as células T_C induzindo uma reação inflamatória localizada não-específica.

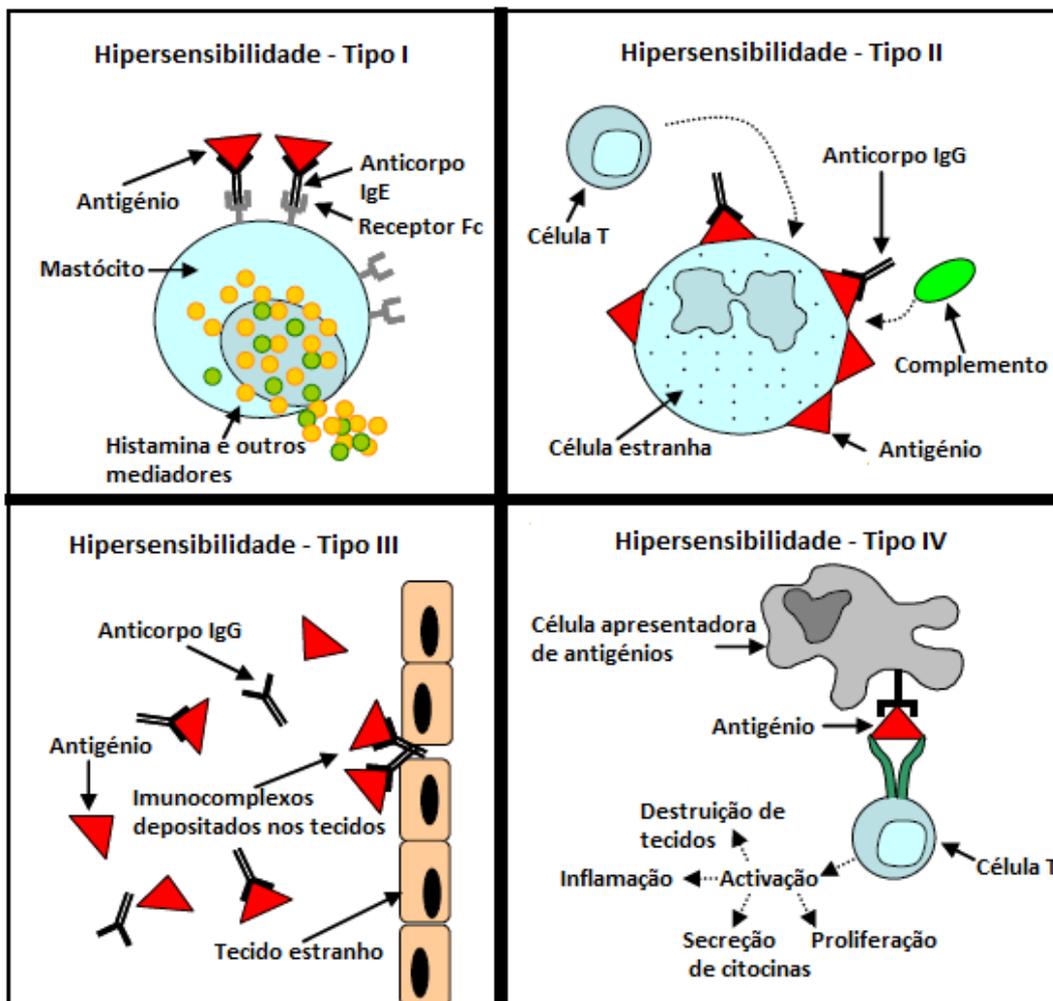


Figura 1: Reações de hipersensibilidade (Adaptado de Marc & Olson , 2009)

A hipersensibilidade do tipo I é, destes quatro tipos de hipersensibilidade, a mais relevante no caso das alergias, e clinicamente, potencialmente mais grave. Esta hipersensibilidade é induzida por um tipo específico de antígenos aos quais chamamos de alérgenos, e é caracterizada pela secreção de IgE específica aquando do contacto com os alérgenos (Kindt, 2007).

A hipersensibilidade do tipo I, também conhecida como atopia, ocorre normalmente em pessoas com pré-disposição hereditária para produzir IgE contra antígenos ambientais (alérgenos).

A reação alérgica é iniciada por um número limitado de alérgenos que entram em contacto com a pele ou com o epitélio das mucosas (Rabson *et al*, 2005).

O processo que desencadeia a hipersensibilidade do tipo I é caracterizado por uma sequência de cinco etapas:

- 1- Exposição aos alérgenos. Estes alérgenos podem ser proteínas ambientais ou substâncias químicas diversas para as quais a maioria das pessoas não produz qualquer resposta;
- 2- Produção de células T_H2 específicas para o antígeno, o que irá induzir a produção de citocinas específicas, nomeadamente IL-4;
- 3- Produção de anticorpos do tipo IgE, responsáveis pela sensibilização dos mastócitos;
- 4- Ligação dos anticorpos IgE aos recetores $Fc\epsilon RI$ dos mastócitos
- 5- Estimulação dos mastócitos por exposição continuada ao alérgeno, o que irá induzir a libertação de mediadores de inflamação pelos mastócitos, designadamente histamina, responsável pela subsequente reação alérgica (Abbas & Lichtman, 2005).

Após o contacto dos alérgenos com o organismo, estes são reconhecidos pelos linfócitos B, que possuem receptores de membrana, aos quais aqueles se ligam. Este processo leva à ativação dos linfócitos T auxiliares. As células T iniciam, então, a sua diferenciação em células T_H2 produzindo citoninas, entre as quais se destaca a IL-4, indutora da síntese de IgE pelos linfócitos B ativados (Kindt, 2007; Roitt *et al*, 1996).

A IgE produzida liberta-se da superfície das células B e após a sua entrada na corrente sanguínea vai procurar ligar-se ao domínio α dos recetores $Fc\epsilon RI$, presentes nas membranas dos mastócitos, tornando-os sensíveis e reativos à presença daqueles

antigénios. Esta fase do processo de hipersensibilização imediata é conhecida como fase de sensibilização (Abbas & Lichtman, 2005).

A exposição continuada aos alergénios induz a sua adesão às IgE específicas fixadas na superfície dos mastócitos, que formam uma ligação designada *cross-link*, caracterizada pela ligação de um antigénio a duas IgE adjacentes à superfície de um mastócito, levando a um aumento do nível de cálcio intracelular, que caracteriza o início da ativação celular conducente à sua desgranulação com libertação de mediadores vasoativos, promotores da reação alérgica (histamina e proteases) e de mediadores lipídicos (leucotrienos e prostaglandinas) e citocinas (TNF, IL-4 e IL-5). Estes mediadores induzem alterações fisiológicas e anatómicas que são identificadas como resposta alérgica. O fenómeno é denominado de fase de contato secundário ou de provocação (Abbas & Lichtman, 2005, Hamilton, 2010).

Os alergénios e suas principais características

Nos cães o contacto com aeroalergénios (pólenes e ácaros) é uma das principais causas de atopia. No caso de Portugal, e devido ao seu clima temperado, a alergia aos ácaros do pó da casa e às gramíneas assume um importante papel no desenvolvimento das alergias.

As gramíneas podem encontrar-se facilmente em pastos, solos cultivados, solos abandonados e nos relvados presentes nos jardins. Conhecem-se cerca de 20 espécies de gramíneas, sendo as espécies mais relevantes a relva comum (*Cynodon dactylon*), a flor do prado (*Phleum pratense*), o panasco ou pé-de-galo (*Dactylis glomerata*), e o azevém (*Lolium perenne*). A sua polinização ocorre, principalmente, entre Março e Junho, sendo que nalguns casos pode perdurar durante um maior período de tempo (Pol & Brazis, 2007; Taketomi, 2006; D'Amato *et al*, 2007; Palma-Carlos, 1995; Palma-Carlos & Inácio, 1998; Diamantino *et al*, 2006).

Neste estudo escolhemos utilizar duas destas principais gramíneas, a *Dactylis glomerata* (Tabela II, Fig. 2) e o *Phleum pratense* (Tabela 3, Fig. 3), pela sua representatividade em termos de sensibilização.

Os pólenes das gramíneas são pequenos, com 10 a 15 µm de diâmetro, e são facilmente transportados pelo vento. O grão de pólen é composto essencialmente por

hidratos de carbono (13 a 17%), proteínas (11 a 20%), lípidos (1 a 4%) e compostos inorgânicos (1 a 2%), variando de espécie para espécie. A maioria da parte proteica encontra-se no citoplasma e nas paredes do grão de pólen, favorecendo, assim, o seu crescimento, o alongamento do tubo polínico e a fecundação. Porém, esta mesma disposição possibilita a interação entre o pólen e o sistema imunitário (Knox & Suphiogu, 1996; Pettyjohn & Levetin, 1997).

A exposição da população ao pólen está condicionada pelo clima e pelo tipo de vegetação existente na região, sendo a mistura de pólenes existente no ar determinada pela combinação da vegetação existente no local, incluindo a inerente à atividade agrícola. As manifestações de alergia ao pólen são coincidentes com o período de maior concentração polínica na atmosfera (Ross & Fleming, 1994).

- *Dactylis glomerata*

Tabela II: Taxonomia da *Dactylis glomerata* (Adaptado de www.phadia.com)

Reino	<i>Plantae</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>
Ordem	<i>Poales</i>
Família	<i>Poaceae</i>
Género	<i>Dactylis</i>
Espécie	<i>D.glomerata</i>



Figura 2: *Dactylis glomerata* (Adaptado de www.flora-on.pt)

A *Dactylis glomerata* encontra-se amplamente distribuída por todo continente americano, por África, Austrália, Europa e algumas regiões temperadas da Ásia, como o Japão. É uma das gramíneas mais comuns sendo muito utilizada para forragem e feno.

Na Europa a sua polinização ocorre principalmente entre Abril e Julho, podendo estender-se, com menor intensidade até Setembro.

Nesta planta os componentes alergénicos encontram-se principalmente no pólen, mas também podem ser encontrados nas folhas e caules (D'Amato *et al*, 1991; www.phadia.com)

A *Dactylis glomerata* apresenta 5 principais alergénios, apresentados na tabela III.

Tabela III: Alergénios identificados na *Dactylis glomerata* (Adaptado de www.allergen.org; www.uniprot.org)

Alergénio	Massa Molecular (kDa)	Reconhecimento em humanos (%)
Dac g 1	32	95
Dac g 2	11	33
Dac g 3	14	60
Dac g 4	60	88,5
Dac g 5	25/28	

- *Phleum pratense*

Tabela IV: Taxonomia da *Phleum pratense* (Adaptado de www.phadia.com)

Reino	<i>Plantae</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>
Ordem	<i>Cyperales</i>
Família	<i>Poaceae</i>
Género	<i>Phleum</i>
Espécie	<i>P. pratense</i>



Figura 3: *Phleum pratense* (Adaptado de www.flora-on.pt)

O *Phleum pratense* (Fig. 3) encontra-se amplamente distribuído por toda a Europa, Norte de África e Norte da Ásia. Nos últimos anos tem sido introduzido no continente americano, na África do Sul e na Austrália para ser utilizado como fonte de alimentação para o gado. Além de ser umas das gramíneas mais comuns é também muito utilizada na forragem animal.

A sua época de polinização ocorre principalmente nos meses de Junho e Julho.

Na tabela V encontram-se descritos os principais alergénios identificados nesta fonte alergénica.

Tabela V: Alergénios identificados no *Phleum pratense* (Adaptado de www.allergen.org; www.uniprot.org)

Alergénio	Massa Molecular (kDa)	Reconhecimento em humanos (%)
Phl p 1	27	95
Phl p 2	10-12	65
Phl p 4	55	82
Phl p 5	32	95
Phl p 6	11	75
Phl p 7	6	10
Phl p 11	20	32
Phl p 12	14	
Phl p 13	55	

Os alergénios das gramíneas encontram-se classificados em grupos, de acordo com as normas estabelecidas pela International Union of Immunological Societies (IUIS). No grupo 1, de todas as fontes alergénicas, encontra-se um alergénio com uma grande relevância do ponto de vista clínico, uma vez que este é reconhecido, normalmente, por 95% dos indivíduos alérgicos aquela fonte alergénica.

Nos pólenes das gramíneas podemos encontrar algumas isoformas de diferentes proteínas. Estas são, também, reconhecidas pelas IgE, uma vez que apresentam o mesmo peso molecular, diferindo apenas no ponto isoelétrico. Estas isoformas surgem, normalmente, por fenómenos de glicosilação e hidroxilação. (Weber, 2003; King *et al.*, 1995; Fahlbusc *et al.*, 1998; Ong *et al.*, 1993).

O grau de maturação dos pólenes e os procedimentos de extração proteica aplicada aos mesmos podem conduzir a diferentes resultados, tornando, assim, a identificação e caracterização dos extratos alergénicos importante na otimização do diagnóstico e da imunoterapia, utilizadas nos diferentes indivíduos sensibilizados às gramíneas (Niederberger *et al.*, 1998; Taketomi *et al.*, 2006).

- *Dermatophagoides pteronyssinus*

Tabela VI: Taxonomia de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Adaptado de www.phadia.com)

Reino	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Arthropoda</i>
Classe	<i>Aechnida</i>
Ordem	<i>Acariformes</i>
Família	<i>Pyroglyphidae</i>
Género	<i>Dermatophagoides</i>
Espécie	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>



Figura 4: *Dermatophagoides pteronyssinus* (Adaptado de www.phadia.com)

A alergia aos ácaros do pó é uma das que apresenta maior importância nos ambientes interiores (Simon & Kernland, 2011). As espécies de ácaros mais importantes são a *Dermatophagoides pteronyssinus* (Tabela IV, Fig. 4) e a *Dermatophagoides farine*, sendo o *D. pteronyssinus*, aquele que apresenta, geralmente, maior prevalência (Thomas, 2012).

Vários estudos demonstram que este ácaro se encontra amplamente distribuído por todo o mundo (Fernández-Caldas *et al.*, 1993; Rizzo *et al.*, 1997; Montealegre *et al.*, 1997; Nadchatram, 2006) e que cerca de 5% da população mundial apresenta sensibilização para o mesmo (Henszel e Kuzna-Grygiel, 2006)

Os principais alérgenos identificados para *D. pteronyssinus* estão apresentados na tabela VII.

Tabela VII: Alergênios identificados no *Dermatophagoides pteronyssinus* (Adaptado de www.allergen.org; www.uniprot.org)

Alergênio	Massa Molecular (kDa)	Reconhecimento em humanos (%)
Der p 1	24	>75
Der p 2	15	71
Der p 3	31	97
Der p 4	60	46
Der p 5	14	37
Der p 6	25	41
Der p 7	26,30 e 31	53
Der p 8	27	40
Der p 9	29	92
Der p 10	36	5,6
Der p 11	103	41,7-66,7
Der p 14	177	
Der p 20		
Der p 21		
Der p 23	14	

~

2. Problemática

No controlo das alergias induzidas por aeroalergénios como pólenes, fungos e ácaros (Mueller *et al.*, 2000) o recurso à imunoterapia específica mostrou ser muito útil, devendo esta ser o mais dirigida possível (Hnilica, 2006; Willemse *et al.*, 2009). Assim, os métodos de diagnóstico devem ser o mais completos possível.

No diagnóstico das alergias em humanos, as técnicas de microarrays de proteínas (Fall *et al.*, 2009; Jahn-Schmid *et al.*, 2003; Valenta *et al.*, 1999) como o ISAC (Immune Solid-phase Allergen Chip, Thermo Fisher Scientific, EUA) representam uma melhoria, ao permitirem a deteção de pequenas quantidades de IgE específica que, no entanto, podem apresentar relevância clínica.

Uma vez que o ISAC não se encontra disponível para o diagnóstico de alergia em medicina veterinária, a identificação dos espectrotipos por Western Blotting assume uma grande importância. Esta técnica permite identificar o repertório alergénico de cada indivíduo – alergograma individual – de entre o alergoma total de cada uma das fontes alergénicas à qual está sensibilizado e é alérgico, o que possibilitará, num futuro próximo, o melhoramento da imunoterapia molecular específica levando a um aumento da taxa de eficácia clínica (Pauli & Malling, 2010). Permitirá, também, um maior entendimento dos mecanismos de dessensibilização, pelo seguimento da evolução da resposta isotípica, antigenicamente direcionada (Chardin *et al.*, 2005; Pauli & Malling, 2010).

A caracterização de alergénios para cães com dermatite atópica iniciou-se há cerca de 13 anos, com os estudos de Masuda *et al.* (1999), McCall, *et al.* (2011) e Nuttall, Lamb & Hill (2001), direcionados para os ácaros do pó. Entretanto, dois outros estudos foram também apresentados, um acerca do nível de reconhecimento do alergénio Cry j 1, por soros de cães sensibilizados à *Cryptomeria japonica* (Sakaguchi *et al.*, 2001) e outro, pelo nosso grupo de trabalho, revelando o repertório alergénico da gramínea *Dactylis glomerata* (Martins *et al.*, 2011)

3. Objetivos científicos

O presente trabalho teve como principal objetivo a identificação e caracterização do repertório alergénico do ácaro *Dermatophagoides pteronysinus* e das gramíneas *Dactylis glomerata* e *Phleum pratense* para o cão.

Pormenorizadamente pretendeu-se:

- Estabelecer um método fiável de extração das fontes alergénicas;
- Determinar as condições ideais para as separações proteicas das fontes alergénicas;
- Efetuar uma transferência da separação proteica para uma membrana de fixação;
- Verificar a eficácia da transferência;
- Determinar o pI e o peso molecular dos alergénios reconhecidos através do immunoblot;
- Verificar se existe alguma semelhança ao relatado para humanos.

4. Materiais e Métodos

Preparação dos extratos para a separação proteica.

Os extratos das gramíneas *Dactylis glomerata* de *Phleum pratense* foram obtidos a partir da extração dos respectivos pólenes (Allergon, Suécia), foram submetidos a agitação orbital, durante uma hora em água ultra-pura, seguida de centrifugação a 4000g, durante 10 minutos, guardando-se o sobrenadante a -18 °C.

O extrato de ácaros de *Dermatophagoides pteronyssinus* foi obtido a partir da extração a partir dos respectivos ácaros liofilizados (Allergon, Suécia). Os corpos dos ácaros foram macerados num almofariz, seguindo-se a extração em água bi-distilada na proporção de 1:12,5 e submissão a agitação orbital durante duas horas a +4 °C. De seguida, procedeu-se a uma centrifugação a 4000 g, +4 °C, durante 10 minutos, guardando-se o sobrenadante a -18 °C.

As concentrações dos extratos foram medidas a partir de uma pequena amostra do sobrenadante, segundo o método de Warburg e Christian (Muller & Schweizer. 1993):

$$\text{Cc proteica (mg / mL)} = 1,55 \times \text{Absorvância a } 280 \text{ nm} - 0,757 \times \text{Absorvância a } 260 \text{ nm}$$

Separação das proteínas dos extratos alergénicos

- **Produção de géis de poliacrilamida a 5% para IEF.**

Para a produção dos géis utilizou-se o sistema de “cassete” composto por duas placas de vidro, em que uma delas possui uma moldura espaçadora em forma de “U” com 0,5 mm de espessura, e uma folha de suporte para géis de poliacrilamida (GelBond PAG film – GE Healthcare, Uppsala, Suécia) para a produção destes géis.

A placa de vidro que não possui a moldura espaçadora foi colocada sobre papel absorvente, sobre a bancada, vertendo-se sobre a mesma, aproximadamente 3 mL de água destilada e colocou-se uma folha de GelBond PAG film, com a face hidrofóbica, onde se inscreveram as marcações de aplicação das amostras e marcadores de ponto isoelétrico (Fig. 5) para o corte após a separação, voltada para baixo e a face hidrofílica, com o papel protetor por cima.

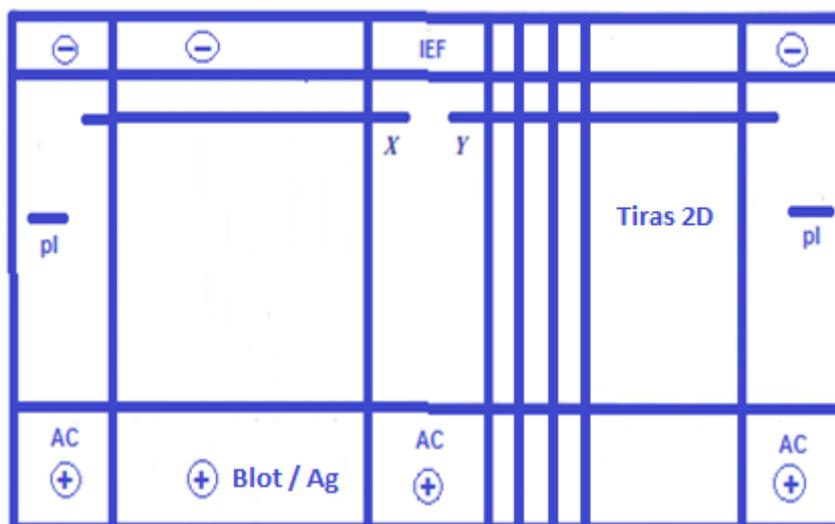


Figura 5 - Esquema do Gelbond para separação por IEF de extrato de açúcar e de gramínea. + e -: lados, respectivamente, ânodo e cátodo, com as linhas horizontais internas adjacentes, de aplicação dos papéis eletrodos. pl – linha de aplicação do marcador de ponto isoeletrico. X e Y – linhas de colocação do aplicador de amostra. AC – faixas a corar pelo Azul de Coomassie. Blot – faixas a transferir por eletrotransferência. Ag – faixa a corar pela prata. As linhas verticais designam os locais de corte para tiras que posteriormente serão sujeitas a 2D.

Ao colocar o GelBond sobre a placa de vidro, devemos assentar primeiro a parte central, para que a água escorra para a periferia, evitando o aprisionamento de bolhas de ar entre a placa de vidro e o GelBond. Este, deve ficar aderido de forma homogênea à placa de vidro e, para tal, fez-se passar um rolo do centro para a periferia, exercendo uma pressão razoável e tendo o cuidado de não fazer deslizar o GelBond da sua posição (Fig.6). Quando foi colocado o GelBond, deixou-se cerca de 2 mm acima do bordo superior (de enchimento) da placa de vidro, para evitarmos que a solução do gel escorra para o espaço entre a placa de vidro e a parte hidrofóbica do GelBond aquando do enchimento da cassete.



Figura 6 - Aplicação do Gelbond de suporte (Adaptado de Westermeier, 1993)

As placas de vidro devem ser previamente silanizadas, mediante a aplicação de Reppel silane (GE Healthcare, Uppsada, Suécia) para evitar que o gel adira ao vidro durante a polimerização, o que originaria o seu rasgamento ao abrir a “cassete”.

As placas de vidro contendo o GelBond no interior foram então fixadas por um conjunto de molas específicas e a cassete assim formada foi colocada sobre a bancada, que deve proporcionar uma base estável e perfeitamente horizontal.

De seguida, preparou-se a solução do gel. Para tal, utilizou-se uma solução stock de acrilamida/metilenobisacrilamida (29:1) a 30%, que pode ser conservada a +4°C e não deve ter mais de um mês para que não possua em teor excessivo de ácido acrílico livre, o qual interfere negativamente na focalização, ao influenciar o estabelecimento do gradiente de pH. Assim, para um gel prepararam-se 20 mL de solução de acrilamida/metilobisacrilamida a 5% em água ultra-pura que foi posteriormente degaseificada sob vácuo, num kitasato, durante 10 minutos. De seguida, adicionaram-se 25 µL de persulfato de amónio (APS) a 40% (recém-preparado) e 15 µL de N, N, N, N-Tetrametiletilenodiamina (TEMED) (o APS funciona como catalisador enquanto que o TEMED dá início à polimerização), homogeneizou-se e aspirou-se a solução com uma seringa de 20 mL, que foi vertida na cassete com o cuidado de não se produzir o aprisionamento de bolhas de ar (Fig.7).

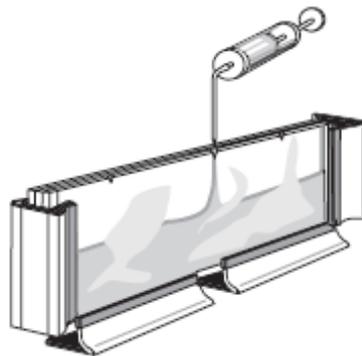


Figura 7 - Enchimento da cassete para formação do gel de poliacrilamida a 5% (Adaptado de Westermeier, 1993)

A parte superior da cassete foi coberta com película plástica aderente “Glad”, de forma a evitar o contacto com o ar uma vez que este dificulta a polimerização, e deixou-se a polimerizar sobre a bancada durante pelo menos uma hora. De seguida, colocou-se a +4 °C durante a noite para que ocorresse a polimerização de forma lenta. Terminada a polimerização, a cassete foi colocada sobre a bancada até atingir a temperatura ambiente, e de seguida foi desmontada, sendo retirado o gel com o

GelBond aderente. Este foi colocado numa solução de lavagem de glicerol a 2% durante 20 minutos sob agitação lenta e em flutuação, devendo o GelBod ficar a superfície da solução. Esta lavagem tem como principais objetivos conferir elasticidade ao gel devido à presença do glicerol e a eluição dos vestígios de APS e TEMED adicionados para a polimerização, de forma a melhorar a posterior focalização.

Para poderem ser armazenados, seguiu-se o passo de desidratação dos géis que podem ser conservados dentro de sacos de plástico devidamente selados durante vários meses à temperatura ambiente. Para a desidratação os géis foram fixados com fita adesiva “scotch” entre o GelBond e uma superfície, e colocados num ângulo de 120°. Foram sujeitos a uma corrente de ar quente produzida por um termoventilador colocado a cerca de 50 cm do gel e regulado para uma potência de 1000W (aproximadamente), de forma a ficar uma temperatura de 50 – 60 °C, junto do gel. Este processo leva cerca de duas horas e pode observa-se facilmente a desidratação completa dos géis, pelo aspeto homogéneo que a espessura da superfície acaba por adquirir.

Para serem utilizados, estes géis desidratados necessitam de sofrer uma re-hidratação. Esta re-hidratação dá-se através da colocação do gel com o GelBond aderente voltado para cima, numa tina de re-hidratação com uma solução contendo a gama de anfólitos desejada. A re-hidratação deve ser homogénea e, para tal, a tina deve estar sob agitação translacional, ou deve proceder-se à elevação periódica do gel, de forma a permitir a distribuição homogénea da solução de re-hidratação (Fig.8). Em ambas as situações a tina deve ser colocada numa superfície perfeitamente horizontal e a re-hidratação deve ser feita, durante 1,5 h.



Figura 8 - Re-hidratação do gel de poliacrilamida a 5% (Adaptado de Westermeier, 1993).

A solução de re-hidratação utilizada era composta pela gama de anfólitos adequada, otimizada para cada tipo de separação (pH 3-10 no caso das gramíneas e

pH 4-6,5 no caso dos ácaros – GE Healthcare, Uppsala, Suécia) a 6,7% em água ultra-pura e 5% solbitol, para ajudar a manter a estabilidade do gel.

Sob a placa refrigerada (“cooling plate” da tina Multiphor II – GE Healthcare, Uppsala, Suécia), através da circulação interna de água termostaticamente mantida a +10 °C por um aparelho termorregulador de fluídos (banho-maria), colocaram-se 3 mL de querosene, de forma a melhor promover o contacto com o GelBond, com vista a manter a homogeneidade térmica do gel durante a separação. O conjunto gel-GelBond já re-hidratado é então colocado sobre a placa refrigerada, assentando-se primeiro a parte central para impedir o aprisionamento de bolhas de ar, o que prejudicaria a homogeneidade térmica, causando os característicos desvios nas linhas de focalização, designados por *smiles*. O excesso de solução de re-hidratação que permanecia à superfície do gel foi absorvido através de sucessivas passagens com o bordo de uma folha de papel Whatman nº1, num ângulo de 45°C (Fig.9). O excesso de querosene foi também absorvido, utilizando folhas de papel Whatman nº1 encostadas aos bordos do GelBond, sobre a placa refrigerada.



Figura 9 - Remoção do excesso de solução de re-hidratação (Adaptado de Westermeier, 1993).

Os eléctrodos (IEF electrodo strips – GE Healthcare, Uppsala, Suécia) foram embebidos nas soluções eletrolíticas adequadas ao gradiente de pH para cada um dos extratos (no caso das gramíneas, para a gama de pH 3-10: ácido aspártico 0,04M para o ânodo e NaOH 1M para o cátodo; no caso dos ácaros, para a gama de pH 4-6,5: ácido glutâmico 0,04M para ânodo e histidina a 0,2M para o cátodo). O excesso das soluções eletrolíticas foi absorvido das tiras de papel eléctrodo através da colocação destas sobre papel absorvente comum por breves instantes. As tiras eléctrodo foram, então, colocadas sobre o gel, à distância de 8 cm entre si. Para melhorar o contacto de toda a superfície dos eléctrodos com o gel adjacente, fez-se passar o cabo de uma pinça ao longo daqueles. De seguida, procedeu-se a colocação dos aplicadores de amostra

(IEF/SDS sample application strips” – GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e de ponto isoelétrico (tiras de papel Whatman nº1 com 5x2mm), respetivamente, à distância de 2 cm e de 4,5 cm do cátodo. Os aplicadores de amostra são comercializados como tiras plásticas com 10 poços de aplicação, a que se cortaram as divisões ente estes, de firma a permitir a aplicação de um volume único de 300 µL de amostra ao longo de 9 cm. Nos aplicadores destinados aos marcadores de pI é colocado um volume de 6 µL.

As condições elétricas necessárias à separação por IEF foram geradas por uma fonte de alimentação que possui a capacidade de produzir voltagens elevadas (Electrophoresis Power Supply – EPS 3501 XL – Amershan Biosciences).

A corrente foi aplicada através de eléctrodos de platina, que ficam em contacto com as tiras de papel eléctrodo. Antes da aplicação da amostra, procedeu-se à pré-focagem, por um período de 30 min. Neste passo, é aplicada uma diferença de potencial ao gel, mediante o estabelecimento de um campo elétrico limitada a 700 V. Esta etapa permite a migração dos anfólitos até estes atingirem o respetivo pI, dispondo-se de forma a estabelecer o gradiente de pH desejado. A linearidade de pH estabelecido depende da mistura de anfólitos utilizada. Após a pré-focagem suspendeu-se a aplicação de corrente elétrica e aplicaram-se as amostras e os marcadores de pI, seguidos de nova aplicação de corrente elétrica. A pré-focagem foi seguida de 3 etapas com diferentes condições de corrente para todas as amostras. As condições de corrente variam para as gramíneas e ácaros. Em baixo está então representado um quadro que possui as condições de corrente, utilizadas para as diferentes espécies. Nas tabelas VIII e IX, encontram-se representadas as condições de corrente utilizadas para as diferentes separações.

Tabela VIII - Condições de corrente utilizada para a separação proteica das gramíneas.

Para as gramíneas			
T (min)	V	mA	W
0-30	700	12	8
30-50	500	2	8
50-130	2000	14	14
130-140	2500	14	18

Tabela IX - Condições de corrente utilizada para a separação proteica do açúcar.

Para os ácaros			
T (min)	V	mA	W
0-30	700	12	8
30-50	500	2	8
50-210	2000	14	14
210-230	2500	14	18

A segunda etapa do processo de focalização ocorre a voltagem mais baixa, o que ajuda a lenta entrada nas amostras no gel, contribuindo para uma melhor focalização, favorecendo a definição das bandas separadas. A última etapa serve para assegurarmos que está completa a focalização das proteínas presentes nas amostras, devendo observar-se as linhas de precipitação das diferentes proteínas, paralelas aos eléctrodos. Consegue-se, desta forma, uma separação com acrescida definição.

Quando concluída a focalização, são retirados os aplicadores de amostra e de pI, e as tiras de papel eléctrodo. O gel é lavado com água ultra-pura, primeiro sobre o local onde estavam aplicadas as tiras de papel eléctrodo, depois na zona de aplicação de amostra e, por último, na zona das linhas de precipitação. O gel, com o GelBond aderente, foi então cortado nos locais previamente marcados e a parte destinada ao Western Blotting foi sujeita a transferência sob pressão para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, Bio-Rad) e as parte assinaladas com “AC” e “Ag” foram sujeitas à coloração pelo Azul de Coomassie e pela prata, respetivamente.

Realizaram-se, ainda, separações por IEF com o objetivo de produção de tiras para a realização de separações bidimensionais. Estas separações apenas se diferenciam pelo esquema desenhado na parte hidrofóbica do GelBond. Nestes casos, após a separação e lavagem do gel com água ultra-pura, como descrito anteriormente, este foi cortado em tiras perpendiculares aos eléctrodos, com 6 mm de largura. Estas tiras encontram-se numeradas e foram guardadas em conjuntos de duas, em sacos individuais de plástico, identificados, que foram congelados de forma rápida e conservados a -20°C.

Separação por IEF em gel de poliacrilamida a 5%

O extrato de *Dactylis glomerata* e de *Phleum pratense*, na concentração de 10 mg/mL foram aplicados no gel (300 µL/9 cm) e submetidos a um gradiente de pH 3 – 10 em géis de poliacrilamida. As proteínas separadas foram posteriormente transferidas, mediante difusão passiva sob pressão, para membranas de PVDF.

O extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* na concentração de 8 mg/ mL foi aplicado no gel (350 µL/ 9 cm) e submetido a um gradiente de pH 4 - 6,5 em géis de poliacrilamida. As proteínas separadas foram posteriormente transferidas mediante difusão passiva sob pressão para membranas de PVDF.

Produção de géis de poliacrilamida a 12% para SDS PAGE

Os géis de poliacrilamida a 12% utilizados foram produzidos em laboratório seguindo, em termos mecânicos, o procedimento descrito anteriormente para o “casting” dos géis de poliacrilamida a 5% para a IEF.

Foram preparadas algumas soluções “stock” necessárias para tornar o trabalho preparatório mais funcional, permitindo, assim, a rentabilização do tempo associada a uma mais prolongada conservação em refrigeração destas soluções. Prepararam-se, então, as seguintes soluções “stock”: tampão do gel (4x concentrado), os tampões do ânodo e do cátodo, e o tampão de amostra não redutor (3x concentrado), que foram posteriormente conservadas a +4 °C, até posterior utilização. Estas soluções podem ser conservadas até um máximo de 6 meses.

Começou-se por fazer as marcações para o corte, após a separação, e para a aplicação das amostras e dos marcadores de peso molecular, com caneta de acetato na face hidrofóbica do GelBond (Fig. 10). Montou-se a cassete de forma semelhante ao descrito para IEF, com a região do cátodo na parte inferior, e colocou-se na vertical sobre a bancada para posterior enchimento.

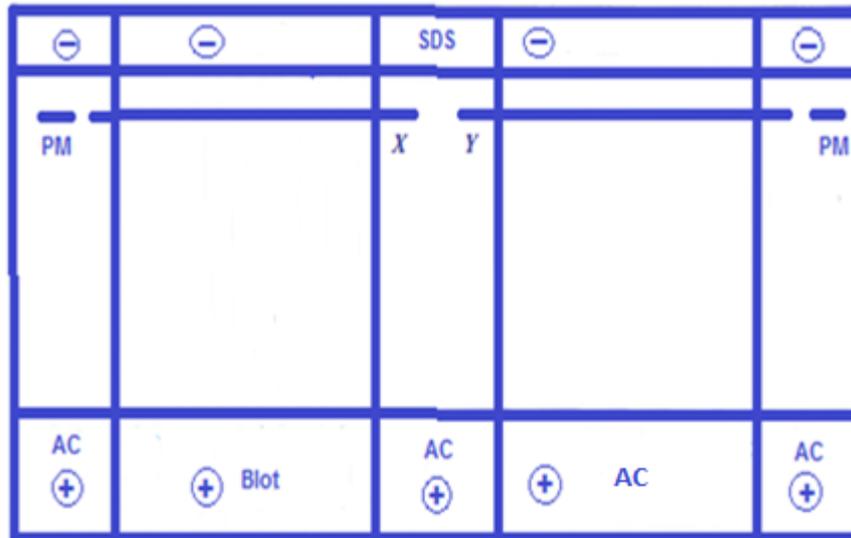


Figura 10 - Esquema do Gelbond para separação por SDS PAGE de extrato de ácaro e de gramínea. + e - : lados, respetivamente, ânodo e cátodo, com as linhas horizontais internas adjacentes, de aplicação dos papéis elétrodos. PM – linha de aplicação do marcador de peso molecular. X e Y – linhas de colocação do aplicador de amostra. AC – faixas a corar pelo Azul de Coomassie. Blot – faixas a transferir por eletrotransferência.

Para o “casting” do gel prepararam-se duas soluções, a de colocação e a de separação, de forma a obter uma boa resolução das diferentes bandas proteicas a separar, com massas moleculares bastante diferentes. A solução de colocação, também chamada de gel concentrador ou de aplicação, possui um poro grande e tem normalmente entre 1 a 3 cm de altura, sendo colocada no topo do gel de separação. Possui como principal função a concentração das proteínas da amostra numa fina banda antes de darem entrada no gel de separação (Quintas *et al.*, 2008)

Começou-se por se verter a solução do gel de colocação para dentro da cassette, com auxílio de uma seringa de 5 mL e, posteriormente, o gel de separação, com uma seringa de 20 mL. O gel de colocação, com glicerol, impede a mistura das duas soluções (de colocação e de separação) antes de polimerizarem. Tapou-se a cassette com película plástica aderente “Glad”, de forma a reduzir o contacto com o ar, uma vez que este dificulta a polimerização, e deixou-se a repousar sobre a bancada até polimerizar (aproximadamente 1 h). O excedente das soluções do gel foi deixado a polimerizar dentro das seringas, para servirem de testemunhas da polimerização. Ao polimerizar, as zonas do gel que contactam com a moldura espaçadora apresentam uma pequena retração, pelo que, quando se observa este fenómeno o gel é colocado a +4 °C “overnight” para que o processo de polimerização se conclua de forma lenta.

O gel pode ser armazenado a +4 °C por um período não superior a um mês. Contudo, as suas características físico-químicas vão-se deteriorando à medida que a conservação prossegue e, portanto, os géis utilizados tinham menos de uma semana.

Para este procedimento foi necessária a produção dos géis eléctrodos, que consistem em tiras de poliacrilamida a 12% preparadas em moldes acrílicos (Fig. 11).

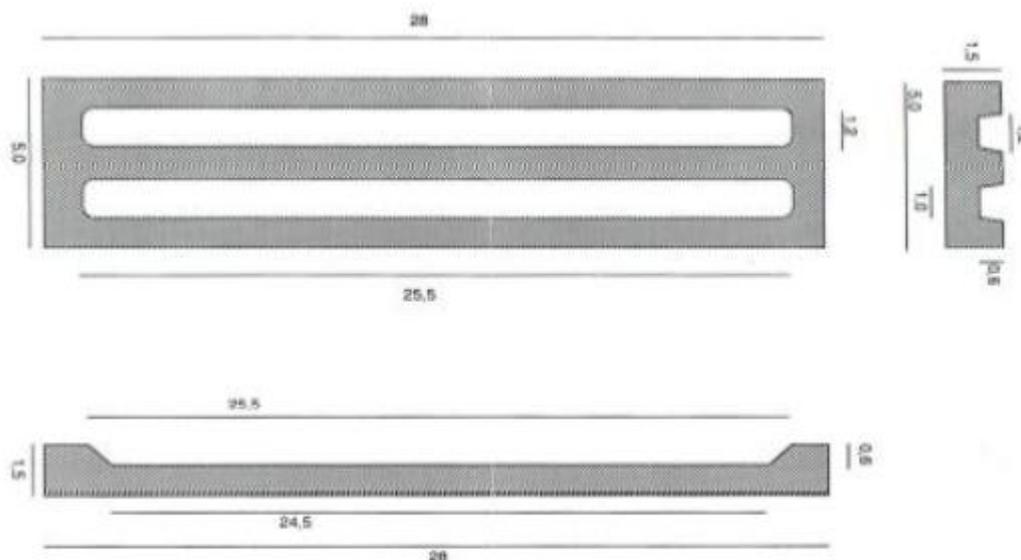


Figura 11 - Esquema de uma placa de "casting" dos géis eléctrodos, para eletroforese horizontal.

Os eléctrodos, ânodo e cátodo, foram preparados em duplicado, na eventualidade de algum deles ficar danificado durante a sua aplicação no gel ou no caso de ficarem aprisionadas bolhas de ar e algum deles polimerizar de forma deficiente. Após a preparação das soluções dos eléctrodos, estas foram colocadas nos dois entalhes das duas placas molde de "casting" dos eléctrodos. As placas molde foram cobertas por placas de vidro, por deslizamento, de forma a impedir o aprisionamento de bolhas de ar no interior, e deixaram-se a polimerizar sobre a bancada. Findada a primeira fase de polimerização, estes foram colocados a +4 °C "overnight", para finalização do processo, de forma lenta.

O gel e os géis eléctrodos, quando armazenados a +4 °C, devem estar num ambiente húmido para evitar a desidratação. Para tal, estes foram colocados dentro de sacos de plástico, selados, colocando-se no seu interior algodão embebido em água destilada.

Separação por SDS PAGE em gel de poliacrilamida a 12%

As amostras a separar foram previamente tratadas com tampão de amostra não redutor (1x concentrado). Este “tratamento” baseia-se na diluição da amostra com o tampão de amostra não redutor e na colocação da solução em banho-maria, a ferver (95 – 100 °C), durante 5 minutos. Esta amostra tratada pode ser armazenada mediante congelação até posterior utilização.

Os géis eléctrodos e o gel a 12% foram retirados do frio e colocados sobre a bancada até atingirem a temperatura ambiente, de forma a evitar a ocorrência de condensação à superfície.

O banho-maria refrigerado foi posteriormente ligado para que atingisse os +10 °C e a placa de arrefecimento se encontrasse à temperatura ideal aquando a colocação do gel.

Após o gel e os géis eléctrodos se encontrarem à temperatura ambiente, e após a placa se encontrar também arrefecida, colocamos cerca de 5 mL de querosene sobre a placa e posteriormente colocamos o conjunto gel/GelBond sobre a placa, tendo sido absorvidos o excesso de querosene. Os géis eléctrodos foram retirados dos respetivos moldes, com luvas humedecidas por água destilada, de forma a evitar danos resultantes de aderência ao material das luvas secas, e aplicadas à distância de 8 cm entre si, como traçado no GelBond.

Colocaram-se a 2 cm do cátodo duas tiras de papel Whatman nº1, com 5 x 2mm, para aplicação do marcador de peso molecular (BioRad) e duas tiras plásticas – “IEF/SDS sample application strips” – de 10 poços (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) com as separações entre eles cortadas de forma a permitir a aplicação de um volume único de 350 µL em 9 cm. Fez-se deslizar o cabo de uma pinça, sobre os géis eléctrodos e sobre as duas tiras plásticas, de modo a melhorar o contacto com o gel e a eliminar as bolhas de ar que possam ter ficado aprisionadas durante a aplicação. De seguida, procedeu-se a aplicação dos marcadores de peso molecular (8 µL – BioRad) e da amostra preparada para a separação por SDS PAGE. Assentaram-se os eléctrodos de platina sobre os respetivos géis eléctrodos e iniciou-se a corrida, aplicando-se, assim, a corrente necessária à separação proteica.

A corrente aplicada para a separação proteica foi a mesma para as gramíneas e para os ácaros. Começámos por aplicar uma corrente limitada a 100 V, durante 30 min, de forma a permitir uma entrada lenta das proteínas da amostra no gel de colocação. De

seguida, aumentámos a voltagem para 110 V, durante 20 min, permitindo que todas as proteínas atingissem o gel de separação. Ultrapassadas estas fases, fez-se uma pausa (aos 50 min de separação) e avançou-se o gel do eléctrodo cátodo cerca de 0,5 cm, para o local do aplicador de amostra, entretanto retirado. Prosseguiu-se a separação, aplicando-se uma corrente limitada a 30 mA, durante 50 min. De forma a finalizar a separação, aumentou-se a corrente para 35 mA. Quando a linha de corrida das amostras se encontra junto ao gel eléctrodo do ânodo termina-se a separação (aos cerca de 150 min), retira-se a placa com os eléctrodos de platina, sendo este lavado imediatamente com água destilada, e remove-se o gel com o GelBond aderente. Procede-se, então, a lavagem do gel com PBS pH 7,4, primeiro sobre as zonas dos eléctrodos e só depois na região média. Posteriormente, limpou-se o querosene presente na face hidrofóbica do GelBond fazendo-se passar este por uma folha de papel absorvente. Cortou-se o gel com o GelBond aderente pelas linhas transversais, de forma a separar as faixas do gel correspondentes às zonas de separação unidimensional da amostra e do marcador de peso molecular. O posicionamento das faixas cortadas foi identificado com um corte no canto inferior direito, junto ao ânodo. Cada uma das faixas seguiu o procedimento anteriormente definido e inscrito na face hidrofóbica do GelBond. Assim, as faixas nas quais se encontrava inscrito “Ag” seguiram para a coloração pela prata, as faixas com “AC” seguiram para a coloração pelo azul de Coomassie e as faixas com “BLOT” seguiram o procedimento descrito para a eletrotransferência (ver adiante).

Separação bidimensional em gel de poliacrilamida a 12%

Para a realização da separação bidimensional é necessária a produção de tiras contendo um espectro de separação por IEF da amostra que pretendemos analisar e a produção de géis de poliacrilamida a 12%, tal como descrito anteriormente.

Este tipo de separação é semelhante à separação por SDS PAGE, apenas diferindo o esquema presente no GelBond e a amostra a aplicar. Tal como na separação por SDS PAGE, o gel e os géis eléctrodos são retirados do frio e colocados sobre a bancada até atingirem a temperatura ambiente e o banho-maria é ligado para que a placa de arrefecimento atinja a temperatura desejada (cerca de 10 °C). Durante este período (cerca de 30 min) as tiras previamente sujeitas a IEF são retiradas do congelador e

colocadas a equilibrar numa solução de equilíbrio específica, 1x concentrada previamente preparada como 3x concentrada, pode ser armazenada no frio até 6 meses. Entretanto, a cassette com o gel para a SDS PAGE a 12% é desmontada e o gel/GelBond aplicada sobre a placa arrefecida com o auxílio de querosene, para uma total adesão do GelBond à placa. Seguidamente procede-se à aplicação dos géis eléctrodos e, após o período de equilíbrio das tiras, estas são aplicadas nos locais destinados à aplicação das amostras. As condições da corrente aplicada são iguais às aplicadas para a separação por SDS PAGE e à semelhança do que acontece na separação por SDS PAGE, aos 50 min fazemos uma pausa na corrida para retirar as tiras, que iremos corar pela prata, e avançamos o gel eléctrodo cátodo para o local onde estavam colocadas as tiras. Quando as amostras estão junto ao gel eléctrodo ânodo, paramos a corrida e “tratamos” o gel de forma igual ao descrito para a separação por SDS PAGE. Assim, as partes do gel marcadas com “Ag” e “AC” são sujeitas, respetivamente, à coloração pela prata e a coloração pelo Azul de Coomassie, e a parte marcada com “BLOT” é sujeita a eletrotransferência (ver adiante).

Transferência das proteínas separadas em gel para membranas de PVDF

- **Difusão passiva sob pressão**

Segundo Al Towbin (1979) a transferência que apresenta melhor eficácia para géis de focagem isoelétrica é a difusão passiva sob pressão. Este processo é bastante simples e consiste em colocar uma membrana de PVDF, previamente embebida em PBS, em cima do gel, seguindo-se a colocação de uma folha de papel Whatman nº 1 e três folhas de papel Whatman nº3. De seguida coloca-se sobre o conjunto uma placa de vidro e um peso de um quilograma decorrendo a transferência por 30 min.

Durante este processo é necessário ter o cuidado de não deixar nenhuma bolha de ar aprisionada pois impedirá a transferência nesse local, comprometendo o processo de Western Blotting.

O processo de transferência fica concluído quando a concentração proteica presente no gel igualar a concentração proteica transferida para a membrana de PVDF.

- **Eletrotransferência**

No caso das proteínas separadas por SDS PAGE, uni- ou bidimensional, o método de transferência para uma membrana de fixação, neste caso particular de PVDF, mais utilizado, é a eletrotransferência, como descrito por Al Towbin (1979) e mais tarde por Burnette (1981).

Na eletrotransferência, as proteínas separadas no gel sofrem transferência para a membrana de fixação por ação de um campo elétrico. Existem dois métodos de eletrotransferência, um em que é utilizado um sistema imerso em tampão dentro de um tanque, e outro designado de semi-seco em que são utilizados como eléctrodos placas de grafite (Westermeier, 2005).

Neste procedimento optámos por utilizar o método semi-seco. Assim, quando terminada a separação proteica a porção do gel destinada a transferência para membrana de PVDF foi lavada com tampão de transferência e, sobre a qual foi colocada a membrana de PVDF, previamente embebida em tampão de transferência. A membrana de PVDF deve ter a mesma largura do gel e deve ser cerca de 1,5 cm mais comprida que a área de separação (entre eléctrodos). Após a membrana estar corretamente aplicada sobre o gel (sem bolhas de ar), destacou-se o gel do GelBond com recurso ao sistema “Film Remover” (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Este sistema faz passar um fio de platina sob tensão entre o gel e o GelBond. De seguida, colocaram-se sucessivamente seis folhas de papel eléctrodo (Electroforese Novoblot Paper, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) das mesmas dimensões da membrana de PVDF, embebidas em tampão de transferência sobre o eléctrodo de grafite ânodo (previamente embebido em tampão de transferência), e sobre elas colocou-se o conjunto membrana-gel-GelBond, ficando o GelBond para cima. O GelBond foi então destacado do gel com o auxílio de uma espátula. Regou-se novamente com tampão de transferência e colocaram-se outras seis folhas de papel eléctrodo embebidas em tampão de transferência. Para se ter a certeza de que não ficou nenhuma bolha de ar aprisionada no meio da “sandés”, fez-se rolar um tubo de ensaio. Colocou-se o eléctrodo cátodo, também previamente embebido em tampão, e aplicou-se a corrente necessária a realização da transferência.

A corrente aplicada não deve ser superior a $0,8 - 1 \text{ mA/cm}^2$ de área a transferir e o tempo de transferência depende da concentração proteica do gel e da sua espessura. Neste estudo foi utilizada uma corrente de $0,8 \text{ mA/cm}^2$ durante 1 h.

Após a transferência das proteínas separadas para a membrana de PVDF, esta foi colocada a secar, seguindo-se o seu corte em tiras verticais, perpendiculares às bandas

proteicas separadas (paralelas aos elétrodos), com 3 mm de largura sendo que as tiras das extremidades ficam com cerca do dobro da largura. Cada tira possui uma secção da separação proteica (possuindo uma amostra de todas as proteínas separadas) sendo utilizadas para a detecção de antigénios por Western Blotting, e as tiras das extremidades são utilizadas para verificar a eficácia da transferência. Após a secagem da membrana, ou após o corte das tiras, estas podem ser armazenadas a +4 ° C até posterior utilização.

Verificação da transferência

A eficácia da transferência proteica dos géis para a membrana de fixação foi comprovada através da colocação das tiras das extremidades da membrana de fixação numa solução de tinta-da-china. Assim, verificou-se que existiu a saída das proteínas do gel e a sua fixação à membrana.

A coloração pela tinta-da-china consiste na colocação das tiras da membrana de transferência numa solução de PBS – 0,1% Tween 20, com 0,1% de tinta-da-china comercial. Para evitar que haja precipitação nas tiras é necessário homogeneizar bem a solução seguida de uma filtração. Ao colocarmos as tiras na solução de tinta-da-china devemos, também, ter o cuidado de verificar se as tiras ficaram uniformemente molhadas, estas devem ficar a incubar durante várias horas podendo mesmo ficar “overnight”, sempre sob agitação suave. Após a coloração as tiras são lavadas em água destilada durante alguns minutos e são deixadas a secar ao ar. As bandas transferidas apresentam-se sob uma coloração negra.

Visualização da separação proteica – Coloração e Preservação dos géis de IEF e SDS PAGE (uni- ou 1D e bidimensional ou 2D).

Coloração pelo Azul de Coomassie para géis de IEF

As partes do gel de poliacrilamida destinadas à coloração pelo Azul de Coomassie foram colocadas numa solução de fixação durante 30 min, sob agitação suave, logo após a separação proteica. De seguida procedeu-se a duas lavagens do gel com a solução descorante, durante cerca de 2 min, após o que o gel foi colocado na

solução corante, por cerca de 10 a 15 min até se visualizarem as bandas. Para que as bandas fiquem bem visíveis é necessário proceder a uma última lavagem com a solução descorante, para que as bandas fiquem visíveis em fundo claro. Neste último passo foi necessário mudar várias vezes a solução descorante.

A solução descorante utilizada, com exceção da primeira lavagem, foi reutilizada após a sua reciclagem por filtração através de carvão ativado.

O gel foi, ainda, colocado numa solução de preservação durante 10 min para poder ser armazenado. Após a incubação na solução de preservação o gel foi colocado sobre a bancada, com o GelBond de suporte para baixo. Colocou-se uma folha de celofane (Preserving Cellophane Sheets – GE Healthcare, Uppsala, Suécia), previamente molhada na solução de preservação, na superfície do gel, com cuidado para evitar o aprisionamento de bolhas de ar, e deixou-se a secar por simples evaporação. Quando seco o celofane fica perfeitamente aderido à superfície desidratada do gel permitindo, assim, a sua conservação por um longo período de tempo.

Coloração pelo Azul de Coomassie para géis SDS PAGE e 2D

A metodologia utilizada na coloração pelo Azul de Coomassie dos géis SDS PAGE, uni- e bidimensional, é muito parecida à utilizada na coloração da separação proteica por IEF, diferenciando-se apenas na solução de fixação.

Coloração pela prata

As partes do gel destinadas à coloração pela prata foram primeiramente colocadas na solução de fixação (igual ao primeiro passo da coloração pelo Azul de Coomassie, para, respetivamente, IEF e SDS PAGE) durante 30 min.

Após a fixação, aplicou-se o protocolo do kit comercial (Silver Staining Kit Protein – 2011, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) contendo todos os reagentes requeridos para preparação extemporânea das soluções de sensibilização, reação pela prata, desenvolvimento, de paragem e de preservação. Assim, após a fixação os géis submetidos a separação por IEF foram sujeitos a 3 lavagens de 5 min. em água destilada, seguindo-se a sua colocação na solução de sensibilização, durante 30 min.. Os géis sujeitos à separação por SDS PAGE 1D e 2D não necessitam efetuar as lavagens em água destilada, passando logo à solução seguinte. Procedeu-se a mais 3 lavagens de 5 min. em água destilada, para os géis separados por IEF que, de seguida, foram colocados na solução de reação pela prata, durante 20 min.. Efetuaram-se mais 2

lavagens de 1 min. em água destilada e colocou-se o gel na solução desenvolvimento, cerca 2 a 5 min., até visualização das bandas numa cor castanha amarelada, mas não deixando a coloração ser excessiva. Após o desenvolvimento da cor retirou-se a solução e foi adicionada a solução de paragem, durante 10 min., de forma a parar completamente o desenvolvimento da cor. Fizeram-se mais 3 lavagens de 5 min. com água destilada e colocou-se o gel na solução de preservação. Esta última etapa é igual à já descrita para a secagem e preservação dos géis no final da coloração pelo Azul de Coomassie.

Deteção dos antigénios – Immunoblotting ou Western Blotting

Na deteção dos antigénios por Immunoblotting podem ser utilizados diferentes procedimentos dependendo do tipo de anticorpo a utilizar e do seu sistema de revelação. Neste procedimento utilizámos um anticorpo monoclonal conjugado com biotina e um anticorpo policlonal conjugado com peroxidase, tendo assim dois procedimentos diferentes para a deteção dos anticorpos anti-IgE.

- **Deteção dos antigénios utilizando o anticorpo monoclonal conjugado com a biotina**

As tiras de PVDF, contendo a separação proteica, foram sujeitas a 2 incubações de 30 min com a solução de bloqueio nas caixas “octaline”, para que ocorresse o bloqueio dos locais de fixação remanescentes das membranas. Seguidamente, as tiras foram colocadas a incubar “overnight” com os soros problema, diluídos a 1:10 em tampão de bloqueio. Esta incubação tem como objetivo a ligação dos anticorpos primários (de cada soro testado) às diferentes proteínas (do antigénio) fixadas na membrana e para as quais apresentavam especificidade.

Para termos a certeza de que não há reconhecimento inespecífico de algumas proteínas devemos sempre fazer, pelo menos, um controlo. Este controlo pode ser feito ao não incubarmos uma das tiras com soro problema ou com o anticorpo secundário comercial anti-IgE. Esta ou estas tiras controlo não deverão apresentar qualquer

reconhecimento, apresentando-se totalmente sem qualquer banda identificada no final do procedimento.

Após a incubação com os soros problema as tiras são lavadas 4x, durante 5 min., com a solução de lavagem, de forma a eliminar as imunoglobulinas não ligadas à membrana de fixação. Segue-se a incubação das tiras com o anticorpo secundário comercial anti-IgE de cão, monoclonal de murganho, conjugado com biotina (AbD Serotec – MCA 1896B) diluído a 1:500 em tampão de bloqueio, durante 2 h. As tiras são novamente sujeitas a 4 lavagens de 5 min com tampão de lavagem para remover a anti-gE que não se ligou.

A detecção do anticorpo secundário conjugado com biotina foi executada com recurso a incubação de 1 h com estreptavidina-fosfatase alcalina (Sigma E 2636) na diluição de 1:5000 em tampão de bloqueio, antes da revelação com a solução cromogénea. Esta incubação permite um aumento da intensidade da cor durante a revelação com a solução cromogénea e a fixação da fosfatase alcalina que vai promover a coloração em presença da solução cromogénea. Seguiram-se mais 4 lavagens de 5 min. cada, com solução de lavagens e por último incubaram-se as tiras com a solução cromogénea até visualização das bandas alergénicas reconhecidas pelo desenvolvimento da cor púrpura característica. A reação foi finalizada por lavagem das tiras com água destilada e estas foram colocadas a secar ao ar.

- **Deteção dos antigénios utilizando o anticorpo policlonal conjugado com a peroxidase**

Os dois métodos de deteção dos antigénios são muito parecidos havendo apenas algumas diferenças no tipo de anticorpo utilizado e no tipo de revelação do mesmo. Assim, o procedimento inicial com duas incubações de 30 min. cada com a solução de bloqueio, à semelhança do que acontece no procedimento descrito anteriormente. Seguidamente, efetuou-se uma incubação “overnight” com os soros problema diluídos 1:10 em tampão de bloqueio. Efetuaram-se 4 lavagens, de 5 min. cada, com a solução de lavagens e procedeu-se a uma incubação de 3 h com o anticorpo secundário comercial anti-IgE policlonal diluído 1:1000 em tampão de bloqueio. Seguiram-se 4 lavagens, de 5 min cada, com a solução de lavagem e incubou-se com a solução cromogénea até à visualização das bandas alergénicas reconhecidas. A reação foi, então, finalizada por lavagem das tiras com água destilada, que foram posteriormente colocadas a secar.

Quando as tiras, que foram sujeitas ao imunoblotting, estiverem totalmente secas e quando as partes do gel coradas pelos diferentes métodos, estiverem também secas procedemos à sua montagem, reconstruindo a membrana original. Esta montagem é feita sobre uma folha de acetato, tendo o cuidado de todos os elementos ficarem completamente alinhados. Assim que a montagem estiver concluída podemos, então, passar à observação e análise dos resultados.

5. Resultados e Discussão

Os cães estão expostos aos pólenes das gramíneas, principalmente durante a sua época de polinização, podendo deste contacto surgir a sensibilização do animal. Os testes intradérmicos e as contagens polínicas dão-nos uma informação pouco precisa acerca das espécies que provocaram a sintomatologia nos pacientes, sendo necessária a identificação das mesmas.

O diagnóstico específico das alergias, em humanos, é realizado com base em métodos *in vivo* e *in vitro*, sendo normalmente composto por 3 principais procedimentos: testes cutâneos, determinação da IgE específica e provas de provocação. Em medicina veterinária este diagnóstico geral baseia-se na anamnese, no estudo dos sintomas e no resultado dos testes intradérmicos e das IgE específicas (Mueller *et al.*,2000; Hill PB, 2009).

Em medicina humana o diagnóstico da alergia está bastante mais desenvolvido podendo recorrer-se ao diagnóstico molecular de alergia, através da utilização da metodologia ISAC (Immune Solid-phase Allergen Chip), desenvolvida pela multinacional Phadia (Grupo GE Healthcare, EUA), o que permite a deteção de concentrações muito pequenas de IgE específicas (Fall *et al.*, 2009; Jahn-Schmid *et al.*,2003; Valenta *et al.*,1999). Em medicina veterinária, o diagnóstico laboratorial não se encontra tão avançado, sendo que a utilização da técnica de Western Blotting, ou Imunoblot, possui uma grande importância, ao permitir identificar os espectrotipos alergénicos individuais (alergogramas individuais) de entre o alergoma de cada fonte alergénica, à qual os animais se encontram sensibilizados e são alérgicos.

No combate às alergias e, nomeadamente, durante a realização de imunoterapia específica, devemos garantir que esta é o mais direcionada possível e que contem os alergénios para os quais o animal está realmente sensibilizado (Hnilica, 2006; Willemse *et al.*, 2009). A realização de uma imunoterapia específica que contenha alergénios para os quais o animal não está sensibilizado, pode favorecer falhas terapêuticas, além de poder provocar novas sensibilizações.

A identificação e caracterização dos alergénios surgem assim, como uma importante etapa no combate às alergias.

Padronização das condições de separação proteica por IEF.

O Western Blotting foi utilizado para a obtenção dos alergogramas individuais de entre o alergoma de cada fonte alergénica. Para que fosse possível utilizar esta técnica, numa primeira fase, recorreu-se a otimização dos métodos de extração proteica. Após uma eficiente extração a concentração proteica foi medida e o extrato foi conservado a -18 °C até posterior utilização.

Numa segunda fase procedeu-se à otimização das condições para a separação proteica por IEF. As condições de corrente foram otimizadas para que houvesse uma separação proteica sem grandes danos, nomeadamente, a ocorrência de “smiles” devido à resistência do gel ou devido à elevada voltagem a que o gel estava sujeito. Durante a otimização das condições de corrente é, também, necessário verificar se o estado de hidratação do gel se mantém. No nosso trabalho, verificámos que a re-hidratação inicial do gel, com a mistura de anfólitos, deve ocorrer por um período de, pelo menos, 1 h, sendo que o tempo de re-hidratação ótimo será de 1 h e 30 min.. Observámos, também, que a manutenção da hidratação do gel durante a focalização era mais eficaz quando se adicionava 5% de sorbitol. Otimizadas as condições de corrente, foi então necessário avaliar qual o melhor local para a colocação da amostra. Para tal, a amostra foi colocada a várias distâncias do cátodo (Fig. 12) e após a sua separação e a coloração do gel pelo Azul de Coomassie, foi escolhido o melhor ponto para a aplicação.

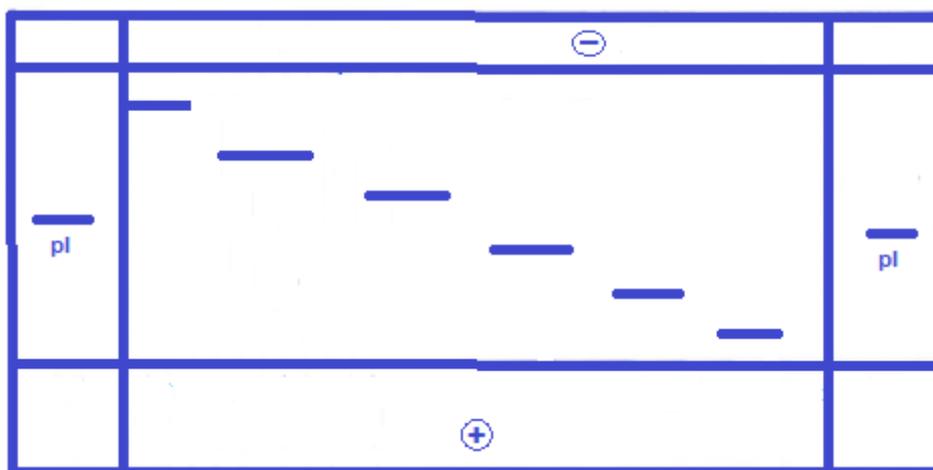


Figura 12: Esquema para escolha do melhor local de aplicação da amostra.

Este processo de otimização das condições foi feito separadamente para gramíneas e para o ácaro. As condições de corrente ótimas para ácaro e para as

gramíneas são semelhantes, possuindo, em ambos os casos, 4 principais etapas. A principal diferença reside no facto de as proteínas dos ácaros necessitarem de um maior tempo de separação para que possam atingir o seu ponto isoelétrico. Por último, foi necessário aferir a concentração a aplicar. Esta concentração deve ser a suficiente para que haja uma correta visualização das bandas proteicas após a coloração com o Azul de Coomassie mas podemos igualmente considerar a coloração pela prata, que é um método mais sensível e, portanto, a concentração proteica não pode ou não necessita ser tão elevada, caso contrário, torna-se muito difícil a distinção das bandas separadas. Sendo assim, a concentração proteica deve ser a mínima detetável na coloração por Azul de Coomassie para que seja corretamente visualizada na coloração pela prata, após um tempo de desenvolvimento mínimo da cor.

Padronização das condições de separação proteica por SDS PAGE (uni- e bidimensional)

As condições utilizadas na realização da separação proteica por SDS PAGE, uni- e bidimensional, são semelhantes às descritas por Martins (2006) e por Martins *et al.* (2005), tendo apenas sofrido pequenos ajustes. Estas condições são semelhantes para ácaros e gramíneas.

Padronização das condições de Western Blotting ou Immunoblotting

Para a realização do Western Blotting foram utilizados dois protocolos diferentes, um utilizando um anticorpo monoclonal e outro utilizando um anticorpo policlonal. Os procedimentos são semelhantes mas possuem algumas diferenças, nomeadamente nas soluções utilizadas.

Para ambos os procedimentos foi necessário aferir a solução de bloqueio a utilizar, o tempo de incubação necessário para cada um dos passos, a composição da solução de lavagem e a composição das soluções cromogénicas.

Existem vários protocolos disponíveis, como os descritos por Smith (2005), mas todos eles estão aptos a serem utilizados com soros humanos. No caso do soro dos cães

observámos que teríamos de alterar algumas das condições dos protocolos já referidos. Assim, começamos por ver qual seria a melhor composição da solução de bloqueio. Nos estudos inicialmente realizados pelo nosso grupo de trabalho, observámos que, apesar de alguns autores referirem a utilização da albumina sérica bovina (BSA), esta revelou ser bastante propiciadora de ligações inespecíficas, pelo que acabaríamos por optar pelo leite em pó desnatado na concentração de 1%, a que se revelou óptima (Martins *et al.*, 2011). Após alguma revisão bibliográfica, observou-se que o leite em pó desnatado poderia interferir com a formação do complexo avidina-biotina, pois possui resíduos de biotina que interferem nos imunoensaios (Gillespie & Hudspeth, 1991), devendo a utilização do mesmo ser exclusiva ao passo do bloqueio (Olson & Markwell, 2007). Contudo, após a realização de alguns ensaios preliminares, chegámos à conclusão que a utilização do leite em pó desnatado não poderia ser reduzida apenas à etapa do bloqueio, pois a sua não utilização durante a incubação com o segundo anticorpo conduzia a ligações inespecíficas das proteínas às membranas de PVDF, resultando num grande “fundo” nos immunoblot, com prejuízo da definição das bandas alergénicas reconhecidas. Em relação ao tempo de incubação com os soros problema, este pode ser de 2 h até “overnight”. No nosso trabalho optámos por colocar os soros a incubar “overnight” visto que também nos ajudou a obter uma melhor intensidade das bandas.

No que diz respeito à solução de lavagem, começámos por utilizar uma solução de tampão fosfato salino com tween 20 (TPBS), mas os fosfatos presentes nesta solução podem levar à inibição da fosfatase alcalina, nomeadamente durante a utilização do anticorpo secundário monoclonal, e, portanto, alterámos a composição da solução de lavagem, começando assim a ser utilizada uma solução de tampão Tris salino com tween 20 (TTBS). Após a otimização de todas estas condições pudemos, então, começar a realização dos ensaios para a obtenção de resultados.

Espetrotipos obtidos através da separação por IEF de um extrato aquoso da fonte alergénica de gramíneas.

Nos espetrotipos obtidos a partir da separação por IEF de gramíneas foram identificados 18 alergénios a partir do Western Blotting de *Dactylis glomerata* (Fig. 13 e Tabela X) com um pI entre 3,70 e 9,15; e 18 alergénios a partir do Western Blotting de *Phleum pratense* (Fig. 14 e Tabela XI) com um pI de 3,95 a 9,80.

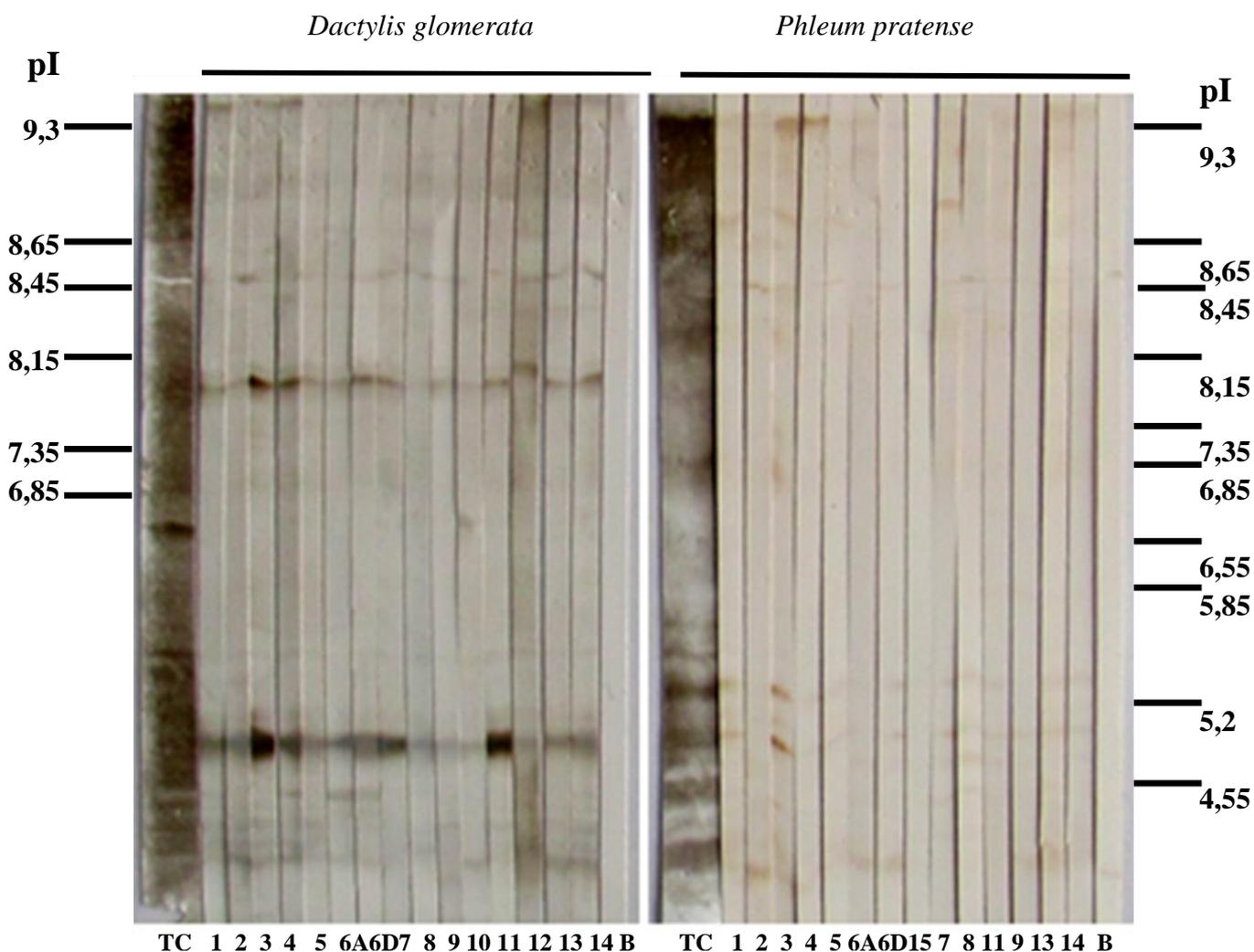


Figura 13: Western Blotting a partir da separação por IEF de *Dactylis glomerata* e *Phleum pratense* revelado com anti-HRP. TC = tinta-da-china; B = branco; números representam o número de pacientes analisados.

Dos 18 alergénios reconhecidos para *Dactylis glomerata* 11 apresentam um reconhecimento major (são reconhecidos por mais de 50% dos indivíduos): 3,90; 3,95; 4,20; 4,30; 4,35; 4,75; 5,40; 7,55; 7,65; 9,10 e 9,15. Os alergénios com pI 3,70; 5,70 e 6,50 são os que apresentam um menor reconhecimento sendo que o alergénio com pI 5,7 é reconhecido por 2 indivíduos e os alergénios com os outros pI são reconhecidos apenas por um indivíduo. O alergénio com pI 4,75 é reconhecido por todos os indivíduos e os alergénios com pI 7,55 e 5,40 apenas não são reconhecidos por 2 indivíduos. Estes 3 alergénios devem ser tidos em conta aquando da utilização da imunoterapia específica, apesar de não se saber se existe alguma relação entre o reconhecimento deste alergénio e o aparecimento de sintomatologia clínica.

Tabela X - Alergénios identificados a partir da IEF de *Dactylis glomerata*.

Paciente	IEF <i>Dactylis glomerata</i>																	
	Pontos Isoelétricos																	
	3,70	3,90	3,95	4,20	4,30	4,35	4,75	4,95	5,40	5,70	6,50	6,80	7,55	7,65	8,25	8,70	9,10	9,15
1		X	X	X	X	X	X	X	X				X	X			X	x
2		X	X	X			X		X			X	X				X	
3		X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
4		X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X
5		X	X	X			X		X			X	X	X				
6A		X		X	X	X	X		X				X	X		X		X
6D		X		X	X	X	X	X	X				X	X				X
7			X				X	X	X			X	X			X		X
8			X				X		X		X					X	X	X
9	X			X			X						X					
10		X					X						X					
11			X	X	X	X	X	X	X				X			X	X	
12		X	X	X	X	X	X		X			X		X	X	X	X	X
13		X	X	X		X	X		X				X		X		X	X
14		X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X		X	X
% Reconhecimento	6,7	73,3	73,3	80,0	53,3	60,0	100,0	46,7	86,7	13,3	6,7	40,0	86,7	53,3	33,3	40,0	60,0	66,7

Na análise da tabela X podemos observar que após uma imunoterapia bem sucedida, o paciente 6 (6A – antes imunoterapia; 6D depois da imunoterapia) modificou o espectrotipo. Antes de iniciar a imunoterapia o paciente 6 reconhecia o alergénio de pI 8,70 que após a imunoterapia deixou de reconhecer, passando a reconhecer o alergénio de pI 4,95.

Apenas 3 dos pacientes reconhecem menos de 8 alergénios, sendo o paciente 10 o que apresenta um menor reconhecimento.

Existe uma correlação não muito forte ($r = 0,69$) entre o número de alergénios reconhecidos e os valores de IgE específicas quantificadas em laboratório.

Tabela XI - Alergénios identificados a partir da IEF de *Phleum pratense*.

Paciente	IEF <i>Phleum pratense</i>																	
	Pontos Isoelétricos																	
	3,95	4,50	4,55	4,75	4,90	5,10	5,40	5,55	6,05	7,10	7,30	7,55	8,10	8,80	9,0	9,35	9,45	9,80
1		X	X		X	X	X	X	X	X			X	X	X			X
2	X	X												X	X			
3	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	X	X			X		X											X
5					X	X	X								X			
6A	X			X	X												X	X
6D	X			X	X		X											
15																		
7		X		X	X		X						X	X	X		X	X
8		X		X	X		X						X					
11				X	X		X						X	X			X	X
9	X				X				X									
13	X	X	X		X		X			X			X	X			X	X
14	X	X		X	X		X						X					X
% Reconhecimento	61,5	61,5	15,4	53,8	76,9	23,1	76,9	15,4	23,1	23,1	7,7	7,7	53,8	46,2	38,5	7,7	38,5	61,5

Dos 18 alergénios reconhecidos para a gramínea *Phleum pratense*, 7 apresentam um reconhecimento maior: 3,95; 4,50; 4,75; 4,90; 5,40; 8,10 e 9,80; sendo que o alergénio com pI 4,9 apenas não é reconhecido pelo indivíduo 2. Os restantes alergénios apresentam um reconhecimento menor sendo que os alergénios com pI 7,30; 7,55 e 9,35 apenas foram reconhecidos por um único indivíduo.

A maioria dos indivíduos apresenta um espectrotipo complexo, sendo que o paciente 3 é o que apresentam um maior reconhecimento de alergénios, reconhecendo 17, dos 18 alergénios identificados.

À semelhança do que ocorre para o espectrotipo da separação por IEF de *Dactylis glomerata*, podemos verificar que no espectrotipo do indivíduo 6 ocorre uma alteração após uma imunoterapia bem-sucedida. Este, deixa de reconhecer os alergénios de pI 9,45 e 9,80 e passa a reconhecer os alergénios com pI 4,90 e 5,40.

Ocorreu uma falha protocolar com a tira do indivíduo 15, tornando impossível a obtenção do seu espectrotipo.

Existe uma correlação com alguma relevância ($r = 0,74$) entre o número de alergénios reconhecidos por cada indivíduo e o valor quantificado de IgE específica.

Espetrotipo obtido através da separação por IEF de um extrato aquoso da fonte alergénica do ácaro.

No espetrotipo obtido através da separação por IEF de *Dermatophagoides pteronyssinus* foram identificados 16 alergénios diferentes contendo um pI entre 4,55 e 7,15 (Fig. 14 e Tabela XII). Dos 16 alergénios identificados 5 apresentam um reconhecimento major: 4,55; 4,60; 4,95; 5,20 e 6,20.

Os indivíduos 4 e 24 mostraram a mesma tendência observada nas gramíneas em que após uma imunoterapia específica bem-sucedida ocorreu alteração do padrão de reconhecimento dos alergénios, alterando-se assim o espetrotipo de reconhecimento alergénico.

O número máximo de alergénios identificados por um único paciente foram 11 (pelo paciente 6) enquanto o paciente 4 apenas reconheceu 2 dos 16 alergénios possíveis.

Os alergénios com pI 7,15 e 6,95 apenas foram reconhecidos pelo paciente 16, sendo os alergénios menos reconhecidos. Já o alergénio com pI 6,20 é o mais amplamente reconhecidos tendo apenas não se manifestado nos pacientes 18, 5 21 e 27A.

Foi encontrada uma correlação de 0,72 entre o número de alergénios reconhecidos e a quantificação de IgE específica quantificada em laboratório para os mesmos pacientes.

Os alergénios major encontrados são amplamente reconhecidos pelos pacientes analisados apresentando um reconhecimento acima dos 75%.

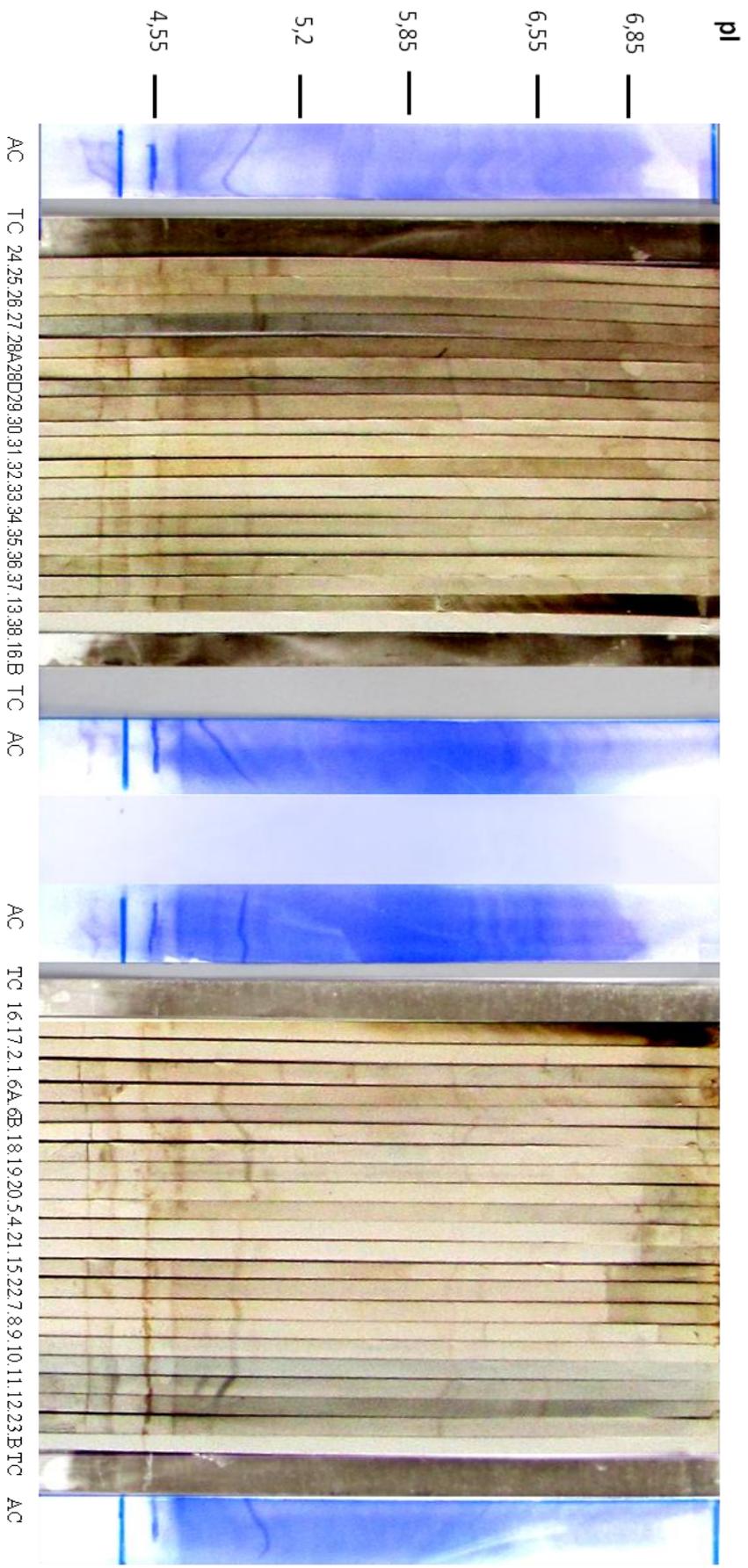


Figura 14 – Western Blotting a partir da separação por IEF de *Dermatophagoides pteronyssinus* revelado com anti-HRP. AC = Azul de Coomassie; TC = tinta da china; B = branco

Tabela XII Alergênios identificados a partir da IEF do açúcar.

Nome	IEF <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>															
	Ponto Isoelétrico															
	4,55	4,60	4,95	5,10	5,20	5,40	5,65	6,15	6,20	6,45	6,55	6,60	6,70	6,80	6,95	7,15
16	x		x					x	x	x	x	x	x	x	x	X
2	x	x				x	x		x				x			
1	x	x			x				x				x			
6A	x	x			x				x							
6D	x	x	x		x			x	x							
17	x	x	x		x				x							
18	x	x	x		x											
19	x	x	x		x				x							
5	x	x	x													
4					x				x							
20					x				x				x	x		
15	x	x	x		x				x			x				
21	x	x	x		x					x						
7	x		x	x	x				x							
8	x	x	x		x				x	x			x			
9	x	x	x		x				x							
10	x	x	x		x				x							
11	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x				
12	x	x	x		x				x	x	x	x				
22		x	x		x				x							
23	x			x	x	x			x							
24	x	x		x			x		x							
25	x	x			x				x							
26	x	x	x		x				x							
27A	x	x	x	x												x
27D		x	x		x				x							x
28	x		x		x				x	x	x	x	x			
29	x	x	x	x					x							
30	x	x	x		x				x							
31		x			x				x							
32	x	x	x		x				x							
33	x	x	x		x				x							
34	x	x	x		x				x							
35	x	x	x		x				x							
36	x	x	x	x	x			x	x				x			
16	x		x					x	x	x	x	x	x	x	x	x
% Reconhecimento	86,1	80,6	75,0	19,4	80,6	5,6	5,6	13,9	88,9	19,4	13,9	16,7	27,8	8,3	5,6	5,6

Espectrotipos obtidos através da separação SDS PAGE unidimensional de um extrato aquoso da fonte alergénica de gramíneas.

A partir do Western Blotting da separação SDS PAGE unidimensional de *Dactylis glomerata* foi possível identificar 11 alergénios (Fig.15 e Tabela XIII), com peso molecular compreendido entre 10,5 e 110 kDa, dos quais 6 alergénios apresentaram um reconhecimento major (PM 25,5; 36,0; 42,0; 50,0; 65,0 e 85,0 kDa). Existem, também, 2 alergénios que apenas são reconhecidos por 1 individuo, PM 110,0 e 47,0 kDa.

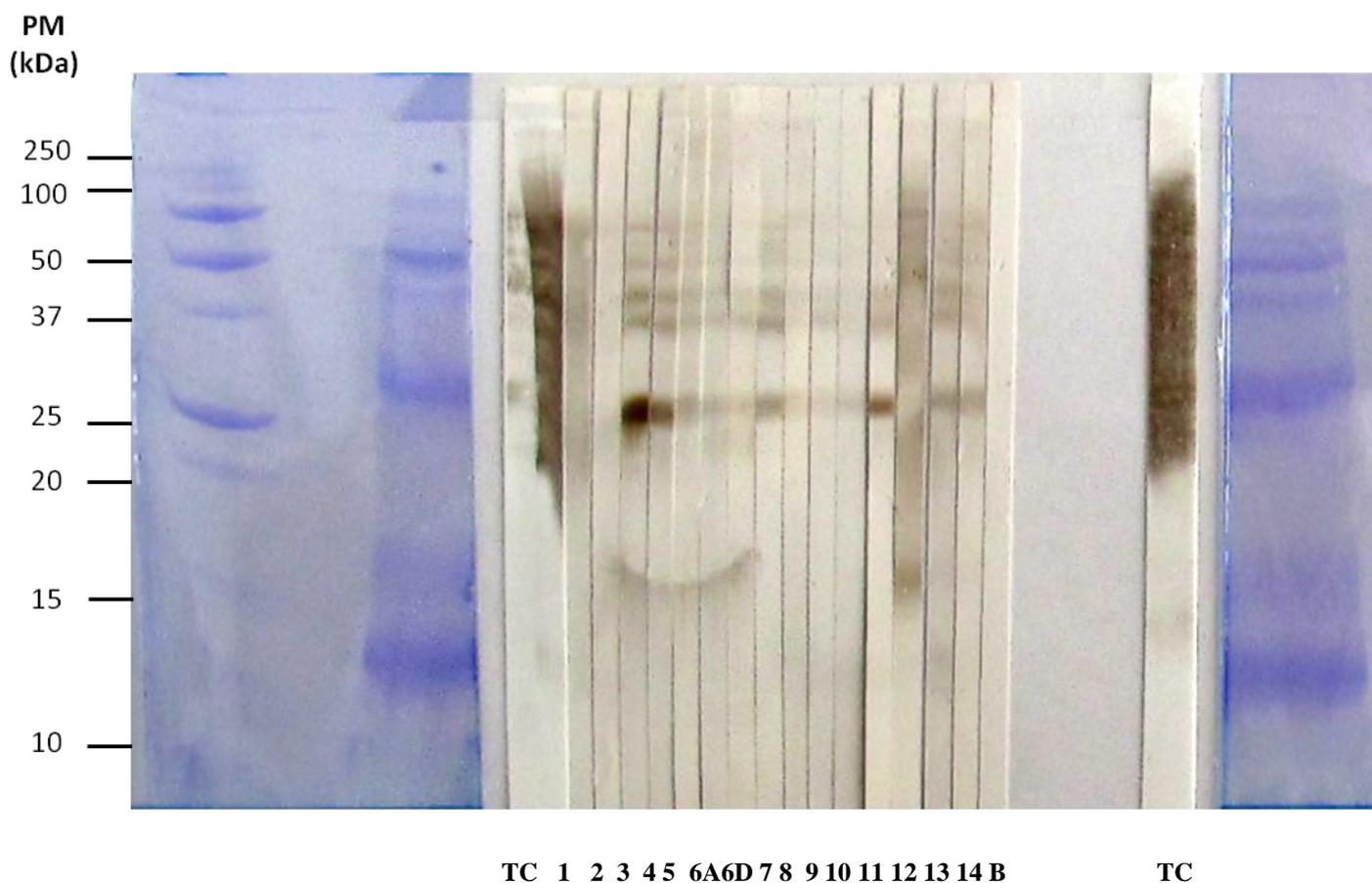


Figura 15 – Western Blotting a partir da separação por SDS PAGE de *Dactylis glomerata*. Os números representam os pacientes, sendo que o soro do paciente 6 foi analisado antes (6A) e após ser sujeito a imunoterapia específica (6D). TC = coloração pela tinta da china; B = branco.

Na tabela XIII pode observar-se que o paciente 6 apresentou uma tendência para alterar o seu espectrotipo após uma imunoterapia específica bem-sucedida, deixando de reconhecer o alergénio com peso molecular 85 kDa.

Tabela XIII Alergénios identificados a partir da separação SDS PAGE de *Dactylis glomerata*.

SDS PAGE <i>Dactylis glomerata</i>												
Paciente	Pesos Moleculares (kDa)											
	10,5	19,0	23,0	25,5	36,0	42,0	47,0	50,0	65,0	85,0	110,0	
1				x							x	
2				x		x		x	x	x		
3			x	x	x	x		x	x	x		
4				x	x	x		x	x	x		
5				x	x	x		x	x	x		
6A			x	x	x	x		x	x	x		
6D			x	x	x	x		x	x			
7				x	x	x		x	x	x		
8	x				x			x	x	x		
9	x			x	x	x		x	x			
10	x			x	x			x		x		
11				x	x	x		x	x			
12		x	x				x		x	x	x	
13	x	x		x	x	x		x	x	x		
14				x	x	x		x	x	x		
% Reconhecimento	26,7	13,3	26,7	86,7	80,0	73,3	6,7	86,7	86,7	80,0	6,7	

Dos alergénios major identificados, os que possuem PM de 25,5; 50 e 65 kDa são os mais amplamente reconhecidos sendo que cada um deles, apenas não é, reconhecido por dois dos pacientes em estudo. Observamos, ainda, que os alergénios major identificados possuem um grande reconhecimento sendo que apresentam uma taxa de reconhecimento superior a 73%.

Por análise da tabela XIII, podemos observar que dos alergénios reconhecidos para cães, 2 deles são, também, reconhecidos em Humanos, 11kDa (Dac g 2) e 25,5 kDa (Dac g 5).

Do Western Blotting da separação SDS PAGE de *Phleum pratense* foi possível identificar 6 alergénios (Fig.16 e Tabela XIV), com peso molecular compreendido entre 11,5 e 136 kDa, dos quais 3 alergénios apresentavam um reconhecimento major: 30,0; 65,0 e 136 kDa.

Phl p

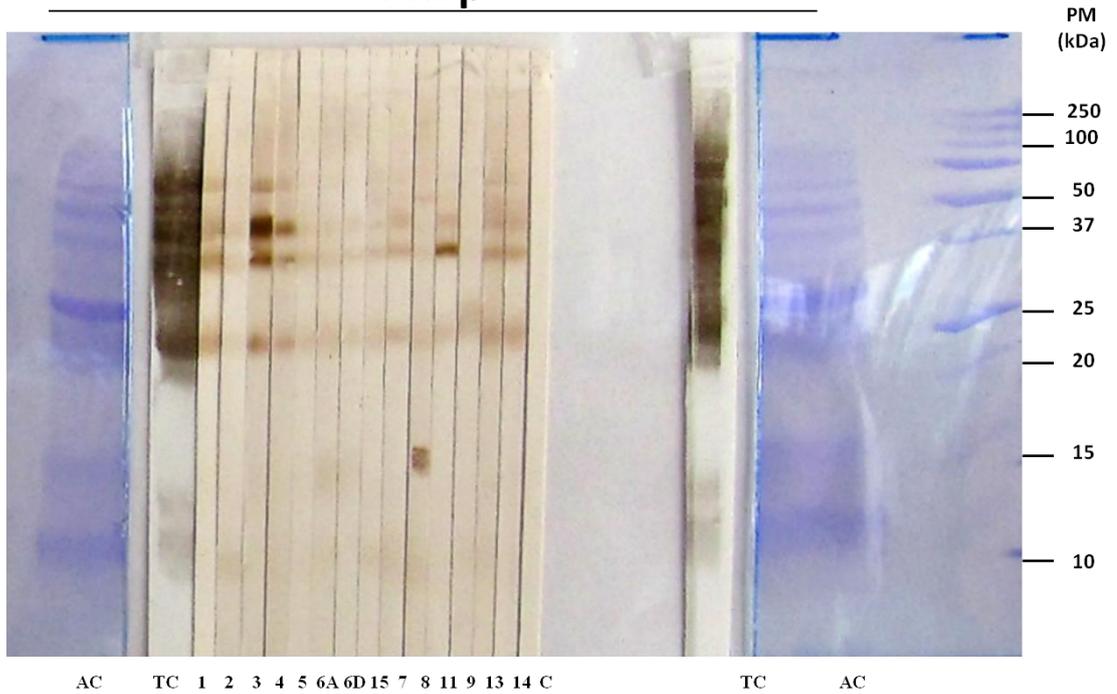


Figura 16 - Western Blotting a partir da separação por SDS PAGE de *Phleum pratense*. AC = Azul de Coomassie; TC = tinta da china; 1 a 14 indivíduos estudados.

Tabela XIV Alergénios reconhecidos no immunoblotting da separação por SDS PAGE unidimensional de *Phleum pratense*.

SDS PAGE <i>Phleum pratense</i>						
Paciente	Pesos Moleculares					
	11,5	17,5	30,0	65,0	95,0	136,0
1			X	X		X
2	X		X	X		
3		X	X	X		X
4		X	X	X		X
5			X			
6A		X	X			
6D		X	X			
15	X		X	X	X	X
7	X		X	X		X
8	X		X		X	
11			X	X		
9	X		X			
13	X	X	X	X		X
14			X	X		X
% Reconhecimento	42,9	35,7	100	64,3	14,3	50

O alergénio com PM de 30 kDa é amplamente reconhecidos, sendo reconhecidos por todos os pacientes em estudo. Este será um alergénio a ter em conta na utilização da imunoterapia específica.

O paciente 5 é o que reconhece menos alergénios uma vez que apenas identificou o alergénio de 30 kDa.

Neste estudo, o paciente 6 manteve o seu espetrotipo de reconhecimento, não se registando nenhuma alteração como se tinha verificado nos estudos anteriores.

Espetrotipos obtidos através da separação SDS PAGE unidimensional de um extrato aquoso da fonte alergénica do ácaro.

Do immunoblotting da separação SDS PAGE unidimensional de *Dermatophagoides pteronyssinus* foi possível identificar 8 alergénios (Fig.17 e Tabela XVI), com peso molecular compreendido entre 14 e 112 kDa,

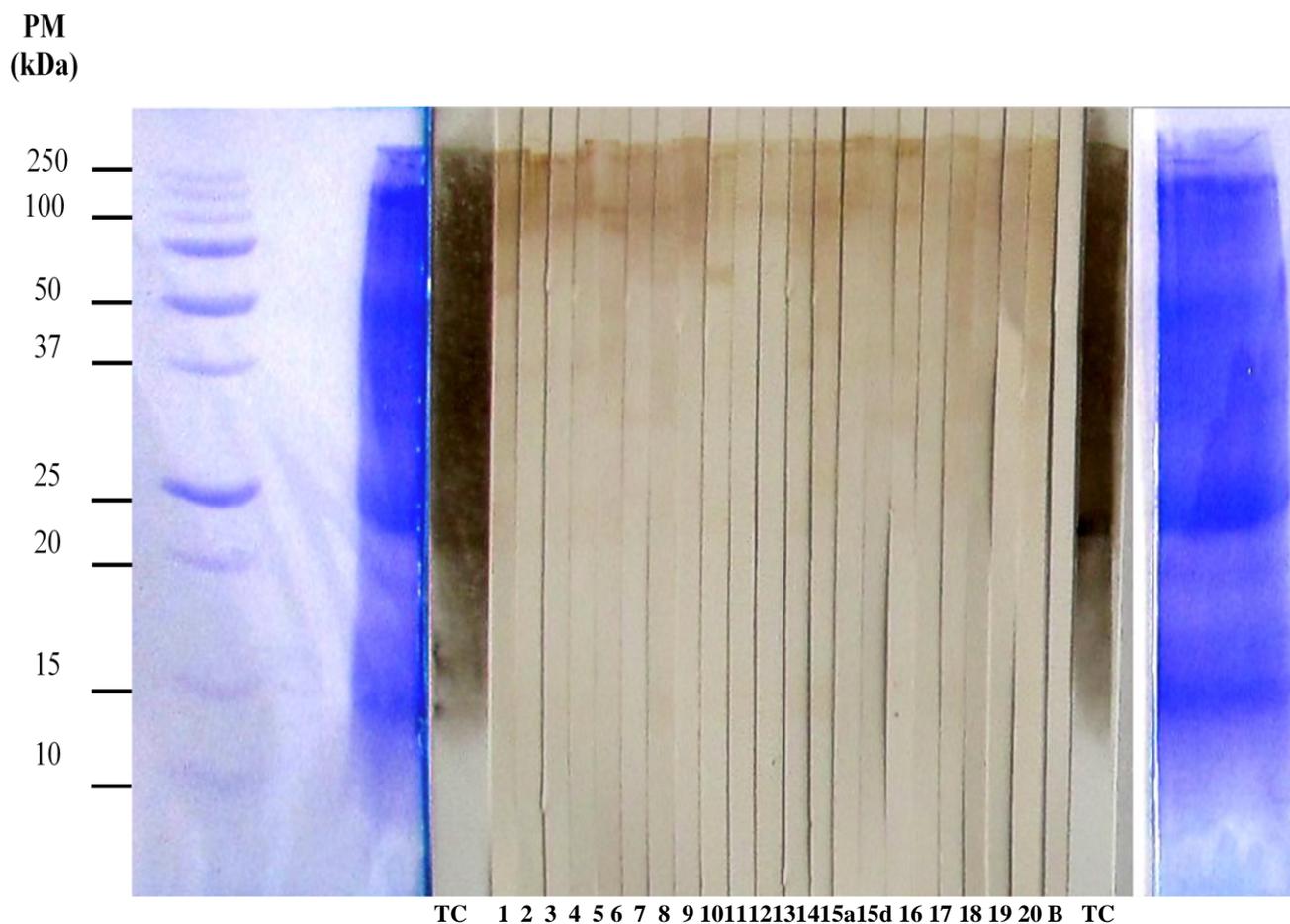


Figura 17 - Western Blotting a paritr da separação por SDS PAGE unidimensional de *Dermatophagoides pteronyssinus*. TC – tinta-da-china; B – branco.

Tabela XV Alergênios reconhecidos da separação SDS PAGE unidimensional de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Paciente	SDS PAGE <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>							
	Pesos Moleculares							
	14,0	27,0	32,0	36,0	44,5	60,0	90,0	112,0
2	x	x		x	x	x		x
17	x							x
37	x							x
19		x	x	x				x
4	x	x	x	x	x	x	x	x
14		x	x			x		x
15	x					x		x
7	x							x
8	x					x		
9								x
10								x
11		x		x	x			x
12	x	x						x
22								x
27A			x					x
27D	x	x	x	x				x
30	x	x	x		x			x
34		x						x
31								x
32	x			x	x			x
	55,0	45,0	30,0	30,0	25,0	25,0	5,0	95,0

Foram identificados 2 alergênios major (14,0 e 112 kDa), sendo que o alergénio com maior peso molecular é amplamente reconhecido uma vez que apenas o paciente 8 não reconhece este alergénio.

O individuo 27, após uma imunoterapia bem-sucedida, passou a reconhecer mais 3 alergénio que não reconhecia antes de ter sido sujeito a imunoterapia. Podemos então observar que existe uma tendência para complexar o espectrotipo após uma imunoterapia específica bem-sucedida.

O paciente 4 reconhece todos os alergênios identificados, sendo o que apresenta o espectrotipo mais complexo. Já os pacientes 9, 10 e 31 apenas reconhecem um dos alergênios identificados. Apesar de existirem muitas diferenças no espectrotipo de reconhecimento dos alergênios, estas diferenças não foram encontradas na observação da sintomatologia clínica apresentada pelos pacientes.

Ao analisarmos a tabela XVI verificamos, ainda, que existem pelo menos 4 alergénios reconhecidos pelos cães que também apresentam reconhecimentos para humanos: 14 (Der p 5), 27 (Der p 8), 36 (Der p 10) e 60 kDa (Der p 4).

Espectrotipos obtidos através da separação SDS PAGE bidimensional de um extrato aquoso da fonte alergénica de gramíneas e de ácaro.

Da separação por SDS PAGE bidimensional de *Dactylis glomerata* (Fig 18) foram identificadas 13 “spots” alergénicas de pI < 3,85 a > 7,9 e de 7 a 112 kDa.

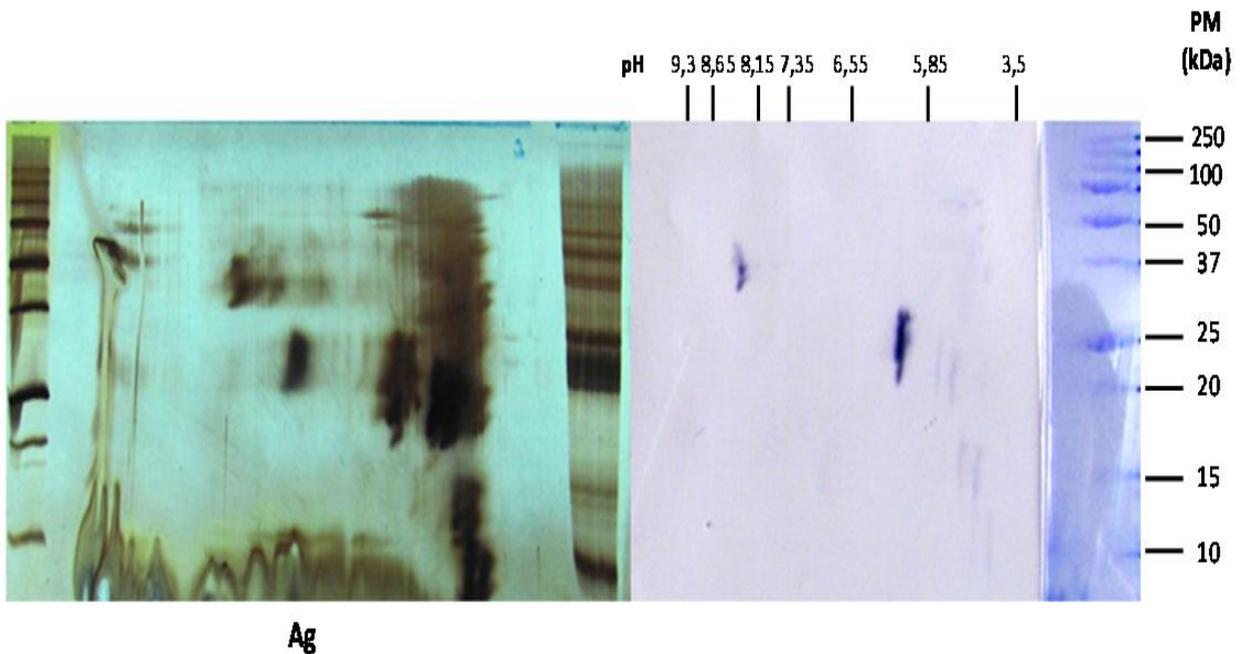


Figura 18 - Immunoblotting da separação SDS PAGE bidimensional de *Dactylis glomerata*.

Da separação por SDS PAGE bidimensional de *Phleum pratense* (Fig. 19) foram identificadas 27 “spots” alergénicas de pI < 3,85 a > 9,7 e de 9 a 85 kDa.

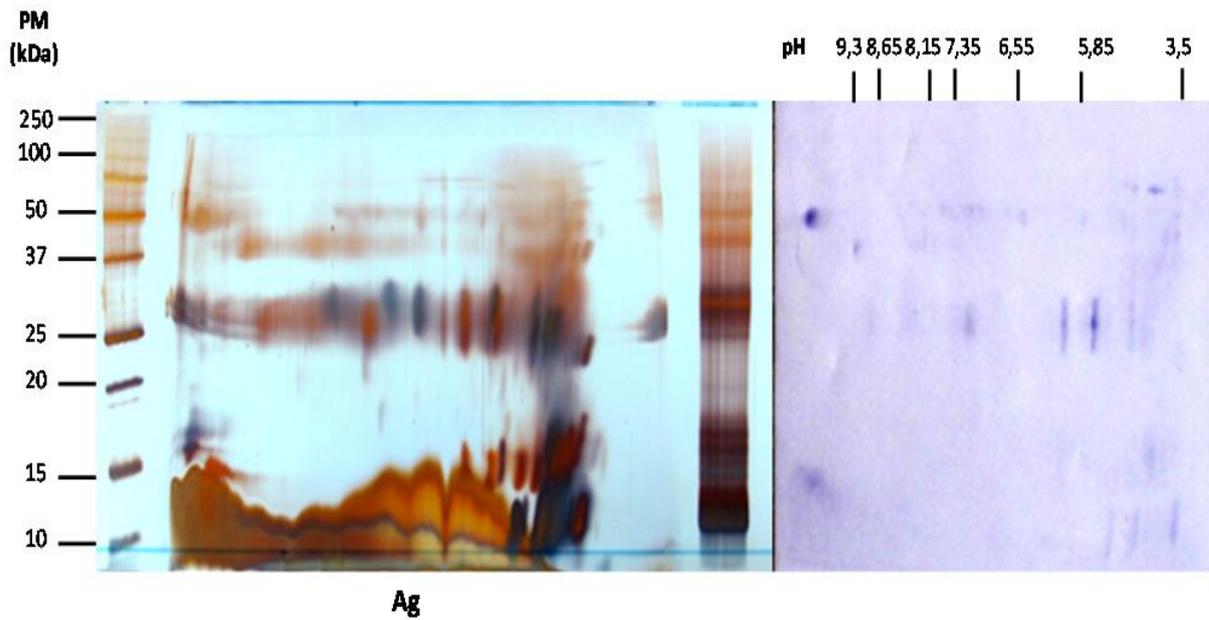


Figura 19 - Immunoblotting da separação SDS PAGE bidimensional de *Phleum pratense*.

Da separação SDS PAGE bidimensional de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Fig. 20) foram identificadas 24 “spots” alergénicas de pI < 4,6 a > 6,9 e 13,5 a 210-220 kDa.

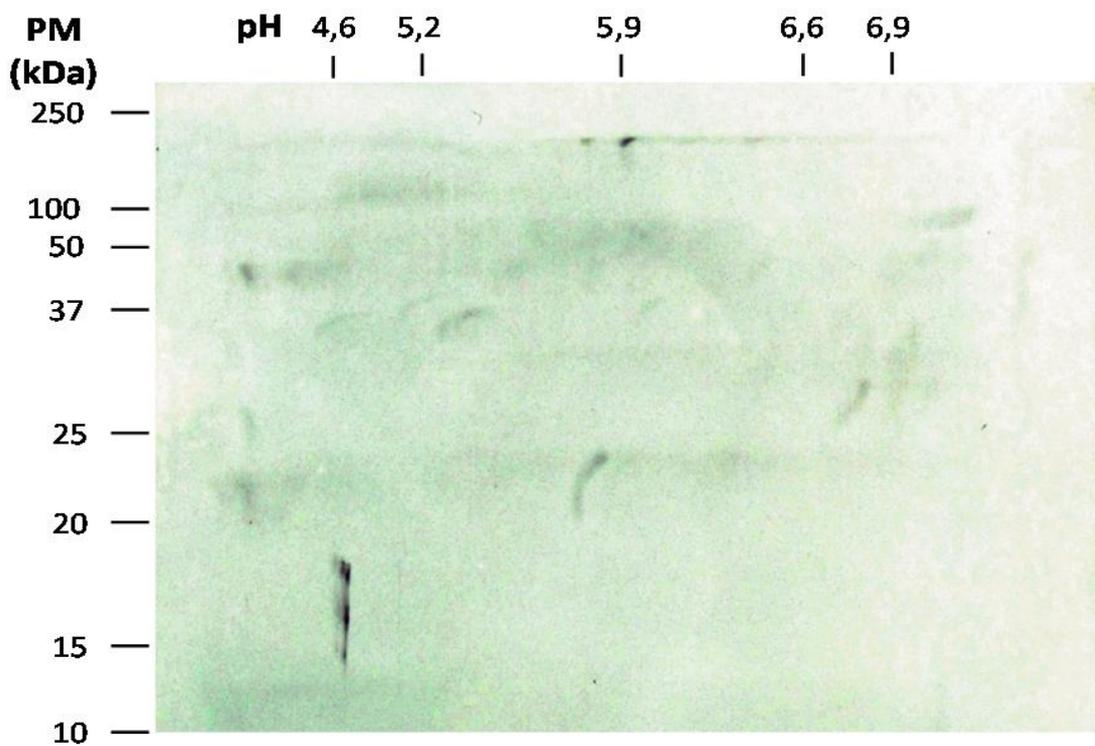


Figura 20 - Immunoblotting da separação SDS PAGE bidimensional de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

6. Conclusões

Por análise dos resultados obtidos é possível concluir que:

- ✓ Apesar de existirem diferenças nos espectrotipos dos vários pacientes analisados, estas não parecem corresponder a diferentes fenótipos;
- ✓ Comparando os resultados obtidos para o reconhecimento de alergénios de *Dactylis glomerata* em humanos (Masuda *et al.*, 1999), utilizando as mesmas técnicas, foi também observada uma grande diversidade de espectrotipos de reconhecimentos de alergénios entre os pacientes, sem correspondência à sintomatologia clínica apresentada pelos mesmos;
- ✓ Após uma imunoterapia específica bem sucedida, os paciente 6 e 27 apresentaram uma tendência para alterarem o seu espectrotipo de reconhecimento alergénico. Isto pode encontrar-se associado a vários mecanismos imunológicos que ocorrem numa fase inicial da imunoterapia (Kindt *et al.*, 2007; Jutel *et al.*, 2003; Creticos *et al.*, 1984), sugerindo assim que não existe qualquer correlação entre a sensibilização e a alergia;
- ✓ Apesar de existir alguma correlação entre o número de alergénios reconhecidos e a quantificação de IgE para as separações por pI, o mesmo não se verificou nas separações proteicas por PM;
- ✓ Analisando os alergénios identificados para o ácaro podemos verificar que existem algumas semelhanças com o descrito para humanos (Martins *et al.*, 2005).

7. Perspectivas Futuras

A identificação dos alergogramas de várias fontes alergénicas com grande relevância clínica deve continuar procedendo-se ao aumento do número de amostras de forma a obter-se uma melhor caracterização clínica e laboratorial do fenótipo alergénicos. Este aumento do conhecimento facilitará, num futuro próximo, um aumento da eficácia da imunoterapia específica, tornando-a mais dirigida quanto possível.

É necessário também realizar estudos de reação cruzada, especialmente nas alergias a gramíneas onde existem vários casos descritos em medicina humana, de forma a não comprometer a eficácia da imunoterapia específica.

Após a finalização destes estudos complementares, torna-se necessário encontrar um método rápido e eficaz que possa ser utilizado na rotina hospitalar em medicina veterinária. Seria, então, importante otimizar alguns dos métodos utilizados na rotina de medicina humana de forma a poderem ser utilizados em medicina veterinária, como é o caso do método Immune Solid-phase Allergen Chip (ISAC – Thermo Fisher Scientific, USA).

Relacionados com estes estudos foram aceites duas comunicações para a 33^a Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica (SPAIC), 5 a 7 de Outubro de 2012 (Referenciadas em: Revista Portuguesa de Imunoalergologia, volume XX, Suplemento 1, Pág. 43-44):

- P22 - O repertório de alergénios das gramíneas *Dactylis glomerata* e *Phleum pratense* para o cão – Possível chave para uma mais efetiva imunoterapia específica? Luís Martins, Andreia Marques, Luisa Pereira, Saul Semião-Santos, Ofélia Bento.
- P23 – O repertório de alergénios do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* para o cão – Sensibilização a quê? Imunoterapia (específica) para o quê? Luís Martins, Andreia Marques, Luísa Pereira, Ana Goicoa, Saul Semião-Santos, Ofélia Bento.

Encontra-se, também, em fase de revisão, de acordo com os referees, o artigo submetido à *Veterinary Dermatology*: The *Dactylis glomerata* (grass pollen) allergen repertoire for dogs – Possible clue for a more effective specific immunotherapy decision. Martins, Luís M.L., Marques, Andreia G., Martins, Ana M.F.L., Bento, Ofélia P.

8. Bibliografia

A

Abbas, A. K. & Lichtman, A. H. (2005) Hipersensibilidade Imediata. *Imunologia Celular e Molecular* (5ªed); 445-465; ELSEVIER Editora Ltda, Rio de Janeiro.

Al Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* September; 79(9): 4350-4354.

B

Barata L.T. (2011) Fundamentos de Imunoalergologia – Da Epidemiologia ao Tratamento; Conceitos/ Aspectos Gerais, pp. 3 – 61; Lidel, Edições Técnicas, Lda.

Brostoff J, Hall T (1998) Hypersensitivity – Type I. pp. 301-317. *In* Roitt I, Brostoff J, Male D (eds). *Immunology*, 15th ed. Mosby, Somerset, UK.

Burnette WN (1981) “Wester blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* April 112(2): 195-203.

C

Chardin H, Peltre G. (2005) Allergome: the characterization of allergens based on a 2D gel electrophoresis approach. *Expert Rev. Proteomics*; 2(5):757-765.

Creticos PS, Van Metre TE, Mardiney MR, Rosenberg GL, Norman PS, Adkinson NF Jr. (1984) Dose response of IgE and IgG antibodies during ragweed immunotherapy. *J. Allergy Clin Immunol.* 73(1): 99-104.

Cromwell O (1997) Biochemistry of Allergens. pp. 797-810. *In* Kay, A.B. (ed). *Allergic Diseases*, vol 2. Blackwell Science, U.S.A.

D

Diamantino C., Caeiro E., Martins L., Almeida F., Lopes M.L. (2006) Sensibilização aos pólenes em crianças com idade inferior a 8 anos. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia* 14(3): 245-249.

D’Amato G., De Palma R., Verga A., Martucci P., Liccardi G., Lobefalo G. (1991) Antigenic activity of nonpollen parts (leaves and stems) of allergenic plants (*Parietaria judaica* and *Dactylis glomerata*). *Allergy* 67(4): 421-4.

D'Amato G., Cechi L., Bonini S., Nunes C., Annesi-Maesano I., Behrendt H., Liccardi G., Popov T., van Cauwenberge P. (2007) Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy* 62(9): 976-90.

F

Fahlbusch B., Müller W-D, Rudeschko O., Jäger L., Cromwell O., Fiebig H. (1998) Detection and quantification of group 4 allergens in grass pollen extracts using monoclonal antibodies. *Clin Exp Allergy* 28(7):799- 807.

Fall BI, Niessner R. (2009) Detection of known allergen-specific IgE antibodies by immunological methods. *Methods Mol Biol.*; 509:107-22.

Fernández-Caldas E., Puerta L., Mercado D., Lockey R.F., Caraballo L.R. (1993) Mite fauna, Der p I, Der f I and *Blomia tropicalis* allergen levels in tropical environment. *Clin Exp Allergy* 23(4):292-7.

Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, Wopfner N, Mari A (2004) Allergic cross-reactivity: from gene to clinic. *Allergy*. 59: 243-267.

G

Gillespie, P.G. & Hudspeth, A.J. (1991) Chemiluminescence detection of proteins from single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:2563-2567.

H

Hamilton, R. G. (2010) Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity; *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125-2, 284-296.

Henszel L. & Kuzna-Grygiel W. (2006) House dust mite in the etiology of allergic diseases. *Ann Acad Med Stetin* 52(2):123-7.

Hill P.B. (2009) Clinical signs and diagnosis of atopic dermatitis. *Proceedings of European Veterinary Conference. Amsterdam, the Netherlands. Dermatology*; (2):3-4.

Hnilica KA. (2006) How to treat allergy in 10 easy steps. *Proceedings of the North American Veterinary Conference; Orlando – Florida*; 20:376-8.

J

Jahn-Schmid B, Harwaneggw1 C, Hillerw R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, Mueller MW. (2003) Allergen microarray: comparison of microarray using

recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy*; 33:1443-49.

Johansson S G O, Hourihane J O'B, Bousquet J, Bruijnzell-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski M L, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, van Hage-Hamsten M, Wüthrich B (2001) A revised nomenclature for allergy. *Allergy*, 56: 813-824.

Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K. (2003) IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol*. 33(5):1205-14.

K

Kay A.B., M.D., PH.D. (2001) Allergy and Allergic Diseases. *N Engl J Med*, Vol 344, No. 1, 30-37.

Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA (2007) Hypersensitivity reactions. Pp.371-400. *Em Kuby – Immunology*, 6th ed. W.H. Freeman and Company. New York, U.S.A.

King T.P., Hoffman D., Lowenstein H., Marsh D.G., Platts-Mills T.A., Thomas W. (1995) Allergen nomenclature. *Allergy* 50(9):765-74.

Knox B. & Suphioglu C (1996) Environmental and molecular biology of pollen allergens. *Trends in Plant Science* 1 (5): 156-164.

M

Marc, D. & Olson, K. (2009) Hypersensitivity Reactions and Methods of Detection. NeuroScience, Inc.

Martins LM (2006) “Identificação e Caracterização do Repertório Alergénico do Caracol Terrestre *Helix aspersa* e Caracterização da Reatividade Cruzada com o Ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, Universidade de Coimbra.

Martins LM, Peltre G, Faro C, Pires E, Inácio F. (2005) The *Helix aspersa* (Brown Garden Snail) Allergen Repertoire. *Arch Allergy Immunol*. 136: 7-15.

Martins L, Marques A, Martins A, Bento O. (2011) The *Dactylis glomerata* (Grass Pollen) Allergen Repertoire for Dog. Poster nr 22. 2nd International Congress of the Southern European Allergy Societies – Lisbon, 31st March to 2nd April. Proceedings em formato digital. pp 9 (www.seas2011.com).

Masuda K, Tsujimoto H, Fujiwara S, Kurata K, Hasegawa A, Yasueda H, Yamashita K, DeBoer DJ, de Weck AL, Sakaguchi M. (1999) IgE sensitivity and cross-reactivity to crude and purified mite allergens (Der f 1, Der f 2, Der p 1, Der p 2) in atopic dogs sensitive to *Dermatophagoides* mite allergens. *Vet Immunol Immunopathol.* 72(3-4): 303-13.

McCall C, Hunter S, Stedman K, Weber E, Hillier A, Bozic C, Rivoire B, Olivry T. (2001) Characterization and cloning of a major high molecular house dust mite allergen (Der f 15) for dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 78(3-4): 231-47.

Montealegre F., Sepulveda A., Bayona M., Quinones C., Fernández-Caldas E. (1997) Identification of the domestic mite fauna of Puerto Rico. *Health Sci J* 16(2): 109-16.

Mueller RS, Bettenay SV, Tideman L. (2000) Aero-allergens in canine atopic dermatitis in south-eastern Australia based on 1000 intradermal skin tests. *Aust Vet J.*;78: 392-9.

N

Nadchatram M. (2005) House dust mite, our intimate associates. *Trop. Biomed* 22(1): 23-37.

Niederberger V., Laffer S., Fröschl R., Kraft D., Rumpold H., Kapiotis S., Valenta R., Spitzauer S. (1998) IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101(2):258- 64.

Nuttall TJ, Lamb JR & Hill PB. (2001) Characterization of major and minor *Dermatophagoides* allergens in canine atopic dermatitis. *Res Vet Sci.* 71(1): 51-7.

O

Olson BJSC & Markwell J (2007) Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Pharmacology.* 38:A.3A.1-A.3A.29.

Ong E.K., Griffith I.J., Knox R.B., Singh M.B. (1993) Cloning of a cDNA encoding a group-V (group-IX) allergen isoform from rye-grass pollen that demonstrates specific antigenic immunoreactivity. *Gene* 134(2):235-40.

P

Palma-Carlos A.G. (1995) Pollinosis in Portugal. XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology, Madrid, Spain p. 685.

Palma-Carlos A.G., Inácio F.F. (1998). Pollinosis in the Southern Europe. Mediterranean area. Clin. Exp. Allergy 28:395 -6.

Pauli G, Malling HJ. (2010) The current state of recombinant allergens for immunotherapy. Curr Opin Allergy Clin Immunol.; 10(6):575-81.

Paul, W. E. (2008) Immunologic Mechanisms in Disease. Fundamental Immunology (6^oed), pp 1376-1425; Lippincott Williams & Wilkins;

Peter Gell & Robert Coombs (1963) referido por: Brostoff J, Hall T (1998) Hypersensitivity – Type I. pp. 301-317. *In* Roitt I, Brostoff J, Male D (eds). Immunology, 15th ed. Mosby, Somerset, UK.

Pettyjohn M.E. & Levetin E. (1997) A comparative study of conifer pollen allergens. International Journal of Aerobiology 13: 259-267.

Pol G. & Brazis P. (2007) Alergenos mais frequentes na dermatite atópica canina. Veterinary Medicine Maio/ Junho: pp 16-19.

Q

Quintas A., Freira AP, Halpern MJ (2008) Purificação, deteção e caracterização de proteínas. pp. 185 – 206. Em Bioquímica: Organização Molecular da Vida, Lidel.

R

Rabson A, Roitt IM, Delves PJ (2005) Hypersensitivity pp. 148 – 163. In Really Essential Medical Immunology, 2nd ed. Blackwell Publishing, Massachusetts, U.S.A.

Reese G, Ayuso R, Leher SB (1999) Tropomyosin: An invertebrate pan-allergen. Int. Arch. Allergy Immunol. 119: 247-258.

Rizzo M.C.V., Fernández-Caldas E., Sole D., Naspitz C.K. (1997) IgE antibodies to aeroallergens in allergic children in São Paulo, Brazil. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 7: 242-8.

Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (1996). *Immunology* (4^oed), 7.1-7.13. Mosby.

Ross A. M. & Fleming D. M. (1994) Incidence of allergic rhinitis in general practice, 1981-92. BMJ 308(6933):897-900.

S

Sakaguchi M, Masuda K, Toda M, Inouye S, Yasueda H, Taniguchi Y, Nagoya T, DeBoer DJ, Tsujimoto H. (2001) Analysis of the canine IgE-binding epitope on the major allergen (Cry j 1) of Japanese cedar pollen with anti-Cry j 1 monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol.*; 78(1):35-43.

Simon D, Kerland Lang K. (2011) Atopic dermatitis: from new pathogenic insights toward a barrier-restoring and anti-inflammatory therapy. *Curr Opin Pediatr* 23:647-52.

Smith JA (2005) *Current Protocols in Molecular Biology – Immunology*, supplement 72. John Wiley & Sons, Inc.

Sohi, D. K. & Warner J. O. (2008) *Understanding allergy; Symposium: allergy*; pp 301-308.

T

Taketomi E.A., Sopelete M.C., Moreira P.R.S., Vieira F.A.M. (2006) Pollen allergic disease: pollens and its major allergens. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 72(4): 562-7.

Thomas WR. (2012) House dust allergy and immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother* 8(10).

V

Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Nlund Gro H. (1999) The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy*; 29:896–904.

W

Weber R.W. (2003) Patterns of pollen cross-allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112(2):229-39.

Westermeier R (2005) *Electrophoresis – A Guide to Theory and Practice* 4th ed. VCH, Weinheim, Germany

Willemse T, Bardagi M, Carlotti DN, Ferrer L, Fondati A, Fontaine J, Leistra M, Noli C, Ordeix L, Scarpella F, Schleifer S, Sinke J, Roosje P. (2009) *Dermatophagoides farinae*-specific immunotherapy in atopic dogs with hypersensitivity

to multiple allergens: A randomised, double blind, placebo-controlled study. *Vet J.*; 180(3):337-42.

Z

Zabriskie John B. (2009) Basic Components of the Immune System. pp. 1-20. *In* Essential Clinical Immunology, Cambridge University Press. New York, U.S.A.

Webgrafia:

- www.phadia.com, consultada em 17 de Fevereiro de 2012
- www.flora-on.pt, consultada em 17 de Fevereiro de 2012
- www.allergen.org, consultada em 20 de Fevereiro de 2012
- www.uniprot.org, consultada em 21 de Fevereiro de 2012

9. Anexos

Soluções utilizadas

- **Solução "stock" de acrilamida/metilenobisacrilamida a 30%**
 - 29% de acrilamida
 - 1% de metilenobisacrilamida

- **Tampão do gel (4x concentrado)**
 - 0,32 M Tris
 - 13,8 mM SDS
 - 0,31 M ácido acético
 - Água bi-destilada para perfazer os 75 mL

- **Tampão do ânodo**
 - 0,3 M Tris
 - 0,3 M ácido acético
 - Água bi-destilada para perfazer 400 mL
 - Orange-G alguns grãos

- **Tampão do cátodo**
 - 0,08 M Tris
 - 0,8 M Tricina
 - 13,8 M SDS
 - Água bi-destilada para perfazer 400 mL

- **Tampão de amostra não redutor (3x concentrado)**
 - 114 mM Tris
 - Adicional 20 mL água destilada e ajustar pH = 6,8 com ácido acético
 - 0,42 M SDS
 - Azul de bromofenol quanto baste
 - Água bi-destilada para perfazer 25 mL

- **Solução descorante**
 - 30% de etanol
 - 8% de ácido acético

- **Solução de coloração pelo Azul de Coomassie**
0,025% de Azul de Coomassie R250 em solução descorante

- **Solução de preservação**
10% de glicerol em solução descorante

- **Solução de fixação para separações por IEF**
20% de ácido tricloro acético em água miliQ

- **Solução de fixação para separações por SDS PAGE**
10% de ácido acético
40% de etanol

- **Solução de equilíbrio das tiras IEF de 1ª dimensão para separação 2D (3x concentrado)**
114 mM Tris
Adicional 20 mL de água bi-destilada e ajustar pH = 6,8 com ácido acético
0,52 M SDS
Azul de bromofenol quanto baste
Água destilada para perfazer 25 mL

- **Tampão eletrotransferência**
39 mM Glicina
48 mM Tris
13,2 SDS
6,24 M Metanol (20% v/v)
Água destilada para perfazer 500 mL

- **Solução de bloqueio**
300 mL de TBS
1% leite em pó
0,1% Tween 20

➤ **Solução de lavagem**

Soro fisiológico

0,1% Tween 20

➤ **Solução cromogénea DAB/NiCl₂**

50 mL TBS

1000 µL DAB “stock” (40 mg/ mL em H₂O destilada)

250 µL NiCl₂ “stock” (80 mg/ mL em H₂O destilada)

150 µL H₂O₂ a 3% (w/v)

➤ **Solução cromogénia NBT/ BCIP (por tira)**

1 mL substrate buffer

33 µL NBT “stock”

3,3 µL BCIP “stock”

Correlações entre o número de alérgenos reconhecidos e a quantificação de IgE específica:

<i>Dactylis glomerata</i>			
Paciente	IEF		SDS PAGE
	Nº alérgenos reconhecidos	IgE específica	Nº alérgenos reconhecidos
1	12	1263	2
2	8	880	6
3	16	3205	8
4	15	646	7
5	8	92	7
6	10	134	7
r	0,69		0,10

<i>Phleum pratense</i>			
Paciente	IEF		SDS PAGE
	Nº alergénios reconhecidos	IgE específica	Nº alergénios reconhecidos
1	12	3426	3
2	4	1685	3
3	17	2336	4
4	5	406	4
5	4	122	1
6	5	89	2
r	0,74		0,47

<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>			
Paciente	IEF		SDS PAGE
	Nº alergénios reconhecidos	IgE específica	Nº alergénios reconhecidos
1	5	359	-
2	6	502	6
4	2	77	8
5	3	83	-
6	6	268	-
17	5	162	3
18	4	122	-
19	5	109	4
r	0,72		0,07