

O Laboratório no Diagnóstico Alergológico

**Jornadas de Actualização Diagnóstica em
Dermatologia e Alergologia Veterinárias
Évora, 30 de Abril a 2 de Maio de 2010**

Luís Martins

Departamento de Medicina Veterinária
Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas
Universidade de Évora



Alergia

Reacção patológica no contacto com substâncias do meio ambiente que não provocam doença nos indivíduos normais.

Clemens Von Pirquet, 1906

Atopia

Tendência de base genética, frequentemente hereditária, para produzir IgE com especificidade para diversos antígenos (alergénios) ambientais, resultando numa frequência acrescida de hipersensibilidade de tipo I.

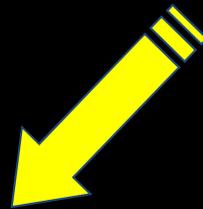
Thompson, 1995

Tendência individual ou familiar para produzir IgE em resposta a doses baixas de alergénios, normalmente proteínas, e desenvolver sintomas típicos como asma, rinoconjuntivite ou eczema/dermatite.

Johansson *et al.* - EAACI, 2001

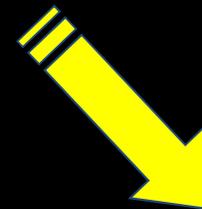
Sensibilização

Produção de IgE após contacto com níveis inócuos de alérgenos ambientais



Reacção Clínica

ALÉRGICO



Sem Reacção Clínica

NÃO ALÉRGICO

Asma
Rinite
Conjuntivite
Diarreia
Vómitos
Eczema
Urticária

Não
IgE

Estudo Etiológico

IgE

Tratamento

Farmacoterapia
Outros

Evicção alérgica
Imunoterapia
Farmacoterapia

Métodos Laboratoriais

Imunidade Humoral

- IgE total
- IgE específicas
- ECP
- Western Blotting
- Microarrays e CRD

Imunidade Celular

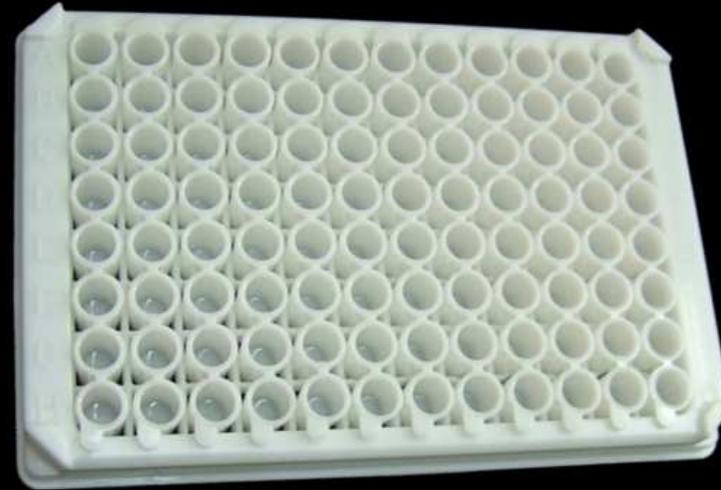
- Teste de libertação de histamina
- TTL
- Imunofenotipagem
- Teste de activação de basófilos

Métodos Laboratoriais

Imunidade Humoral

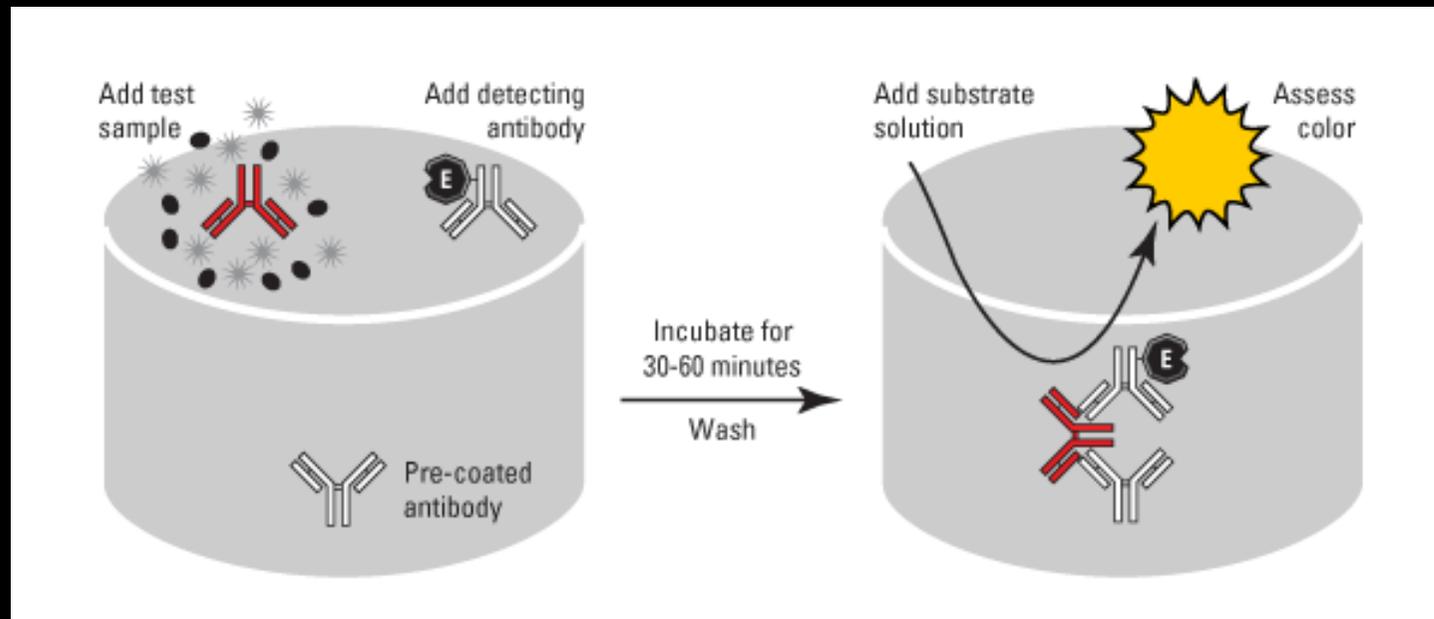
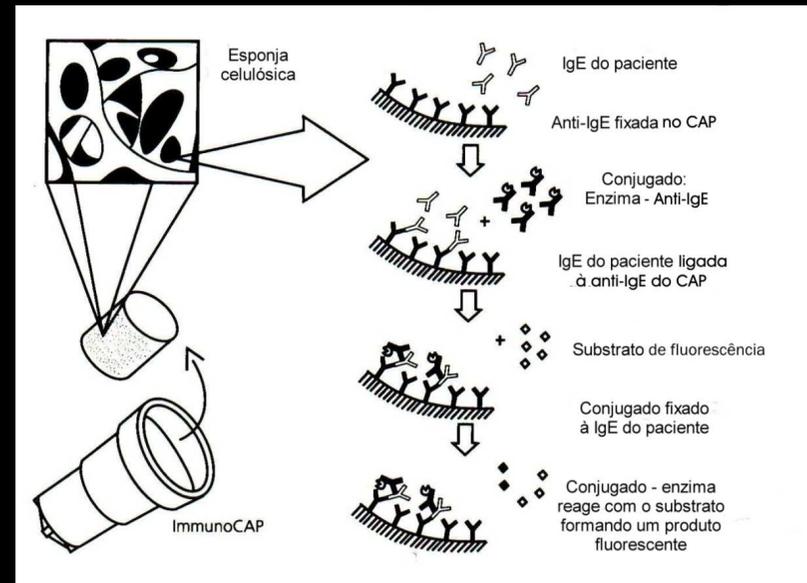
IgE total

- ELISA



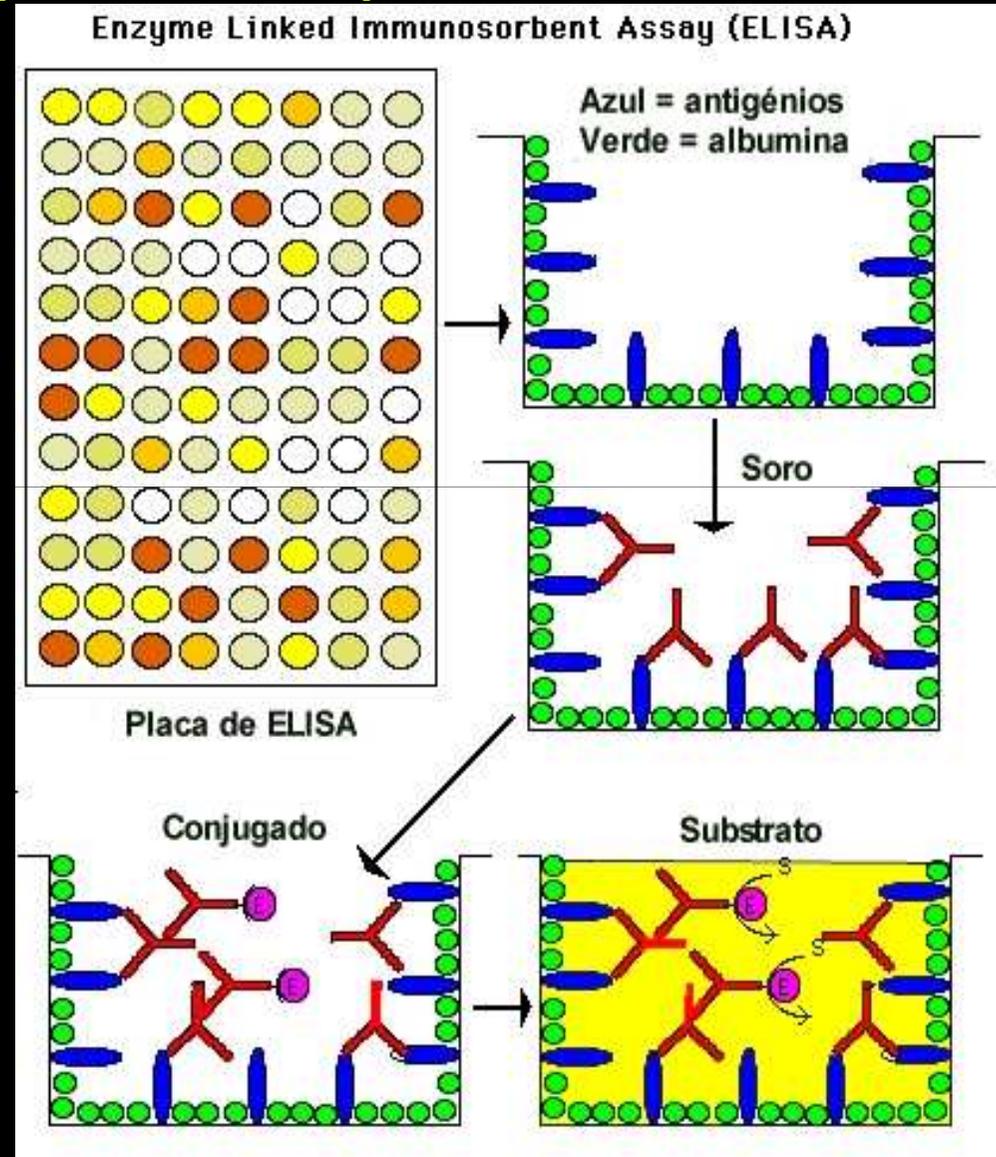
IgE total

- Unicap[®]
(Phadia)



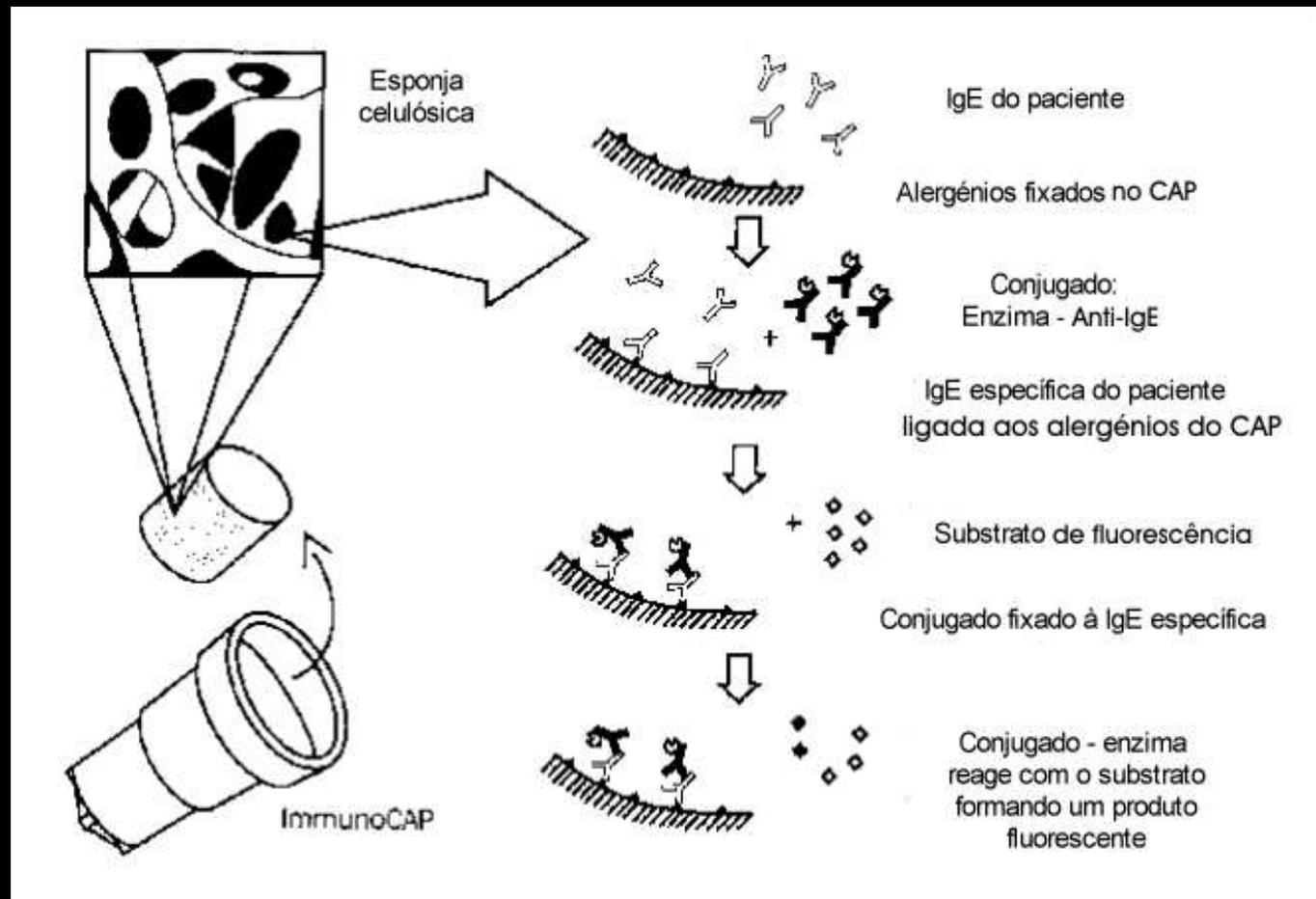
IgE específicas (“RAST”)

- ELISA



IgE específicas (“RAST”)

- Unicap[®]
(Phadia)



IgE específicas (“RAST”)

Classe IgE específica	kU _A /l	Nível IgE específica
0	Inferior a 0,35	Ausente ou indetectável
1	0,35-0,69	Baixo
2	0,7-3,49	Moderado
3	3,5-17,49	Elevado
4	17,5-49	Muito elevado
5	50-99	Muito elevado
6	100 ou superior	Muito elevado

1U IgE = 2,4 ng

ECP (Proteína catiónica dos eosinófilos)

- Mede a inflamação eosinofílica
- Reflecte o efeito da medicação
- Permite calcular a mínima dose eficiente
- Permite seguir a aderência à terapêutica (compliance)
- Doseamento no **soro** e **secreções respiratórias**
- Método de **Radioimunoensaio** (detecção: 2 – 200 µg/L)

ECP (Proteína catiónica dos eosinófilos)

- Útil no diagnóstico e acompanhamento de:

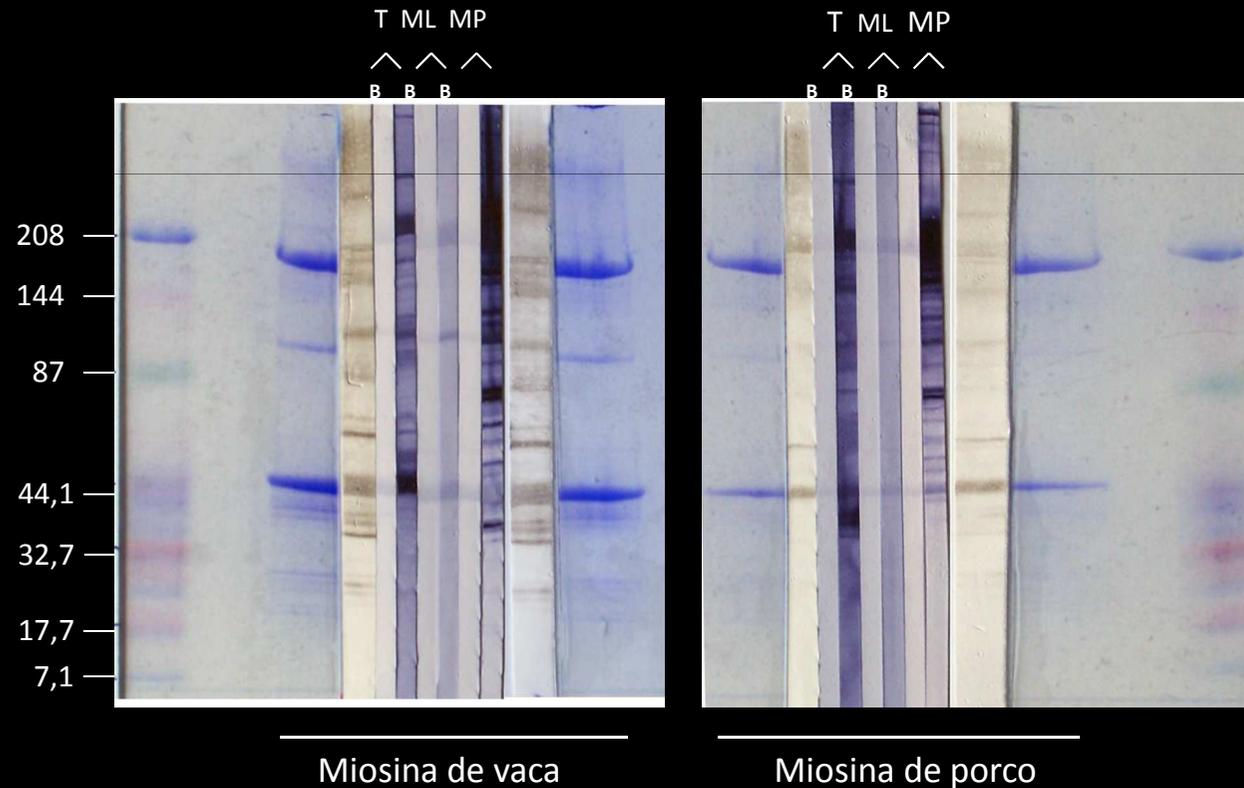
Processos inflamatórios obstrutivos das vias respiratórias

Rinite alérgica

Dermatite atópica

Western Blotting ou Immunoblotting

- O que é?
- Para que serve?



Western Blotting ou Immunoblotting

- Qual o procedimento?



Western Blotting

- Objectivo:

IDENTIFICAR e CARACTERIZAR ALERGÉNIOS

+

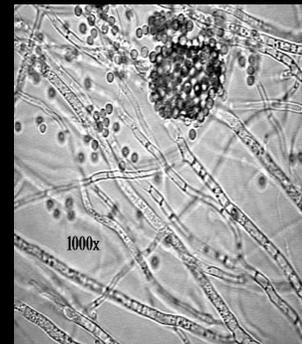
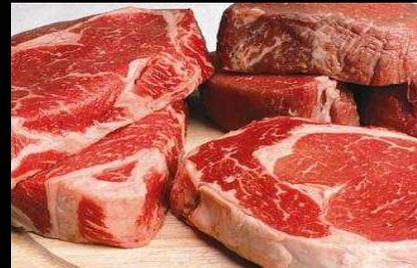
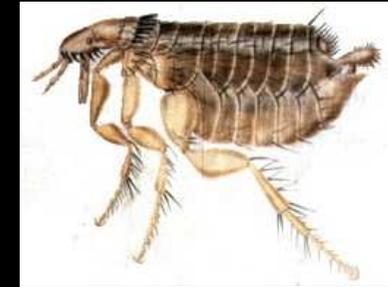
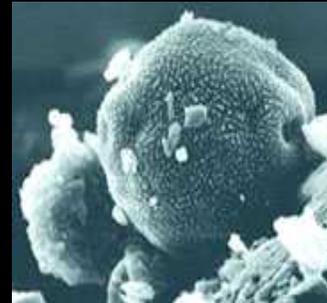
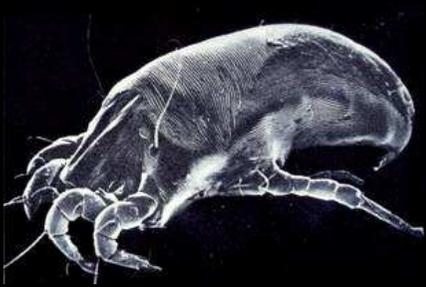
Obtenção de ALERGOGRAMAS e ESPECTROTIPOS

- Via:

Apresentação das proteínas separadas ao reconhecimento pelas Ig

Western Blotting

- Fontes Alérgénicas



Western Blotting

- **Alergénios**

Antigénios que induzem a produção de IgE

Em geral, proteínas com 3 a 80 kDa

Via de contacto ou sensibilização

Pneumalergénios

Trofalergénios

de Contacto

Western Blotting

- **Alergénios**

Fontes alergénicas conhecidas = 1736
(acrécimo de cerca de 700 em 4 anos)

Fontes alergénicas com alergénios identificados = 753

Alergénios conhecidos, exc. isoformas e epitopos = 1779
(acrécimo de cerca de 600 em 4 anos)

Isoformas conhecidas de alergénios = 1218

Western Blotting

- **Alergénios**

Com PM ou pl próximos e homologia sequencial $\geq 67\%$
constituem **1 grupo**

Identificados **28 grupos** de alergénios, de acordo com a
semelhança estrutural, independentemente da origem
biológica

Klysner S, Lowenstein H. Allergen extracts and standardization. *In* Allergic Diseases.
Kay AB (ed.). vol 2. Blacwell Science, 1997:825-834.

Western Blotting

- **Alergénios**

Nomenclatura (ex.):

Amb a 1.0101 ⇒ o alergénio com maior taxa de reconhecimento da espécie *Ambrosia artemisiifolia* (Herbácea); subtipo 1 da isoforma 1

Chapman MD, Pomés A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature and structural biology of allergens. [J. Allergy Clin. Immunol.](#) 2007;[119\(2\)](#); 414-420.

Der p 1 ⇒ o alergénio com maior taxa de reconhecimento da espécie *Dermatophagoides pteronyssinus* (Ácaro)

Taxa de reconhecimento (pacientes):

Major > 50% > Minor

Klysner S, Lowenstein H. Allergen extracts and standardization. *In Allergic Diseases.* Kay AB (ed.). vol 2. Blackwell Science, 1997:825-834.

Western Blotting

- Procedimento : a sequência
- 1º Obtenção das fontes alergénicas

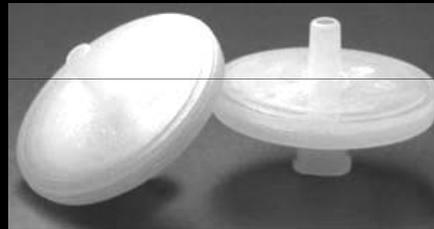


- 2º Extracção proteica



Western Blotting

- Procedimento : a sequência
- **3º Padronização dos extractos**
Remoção de insolúveis



Ajuste da Concentração ao protocolo de separação



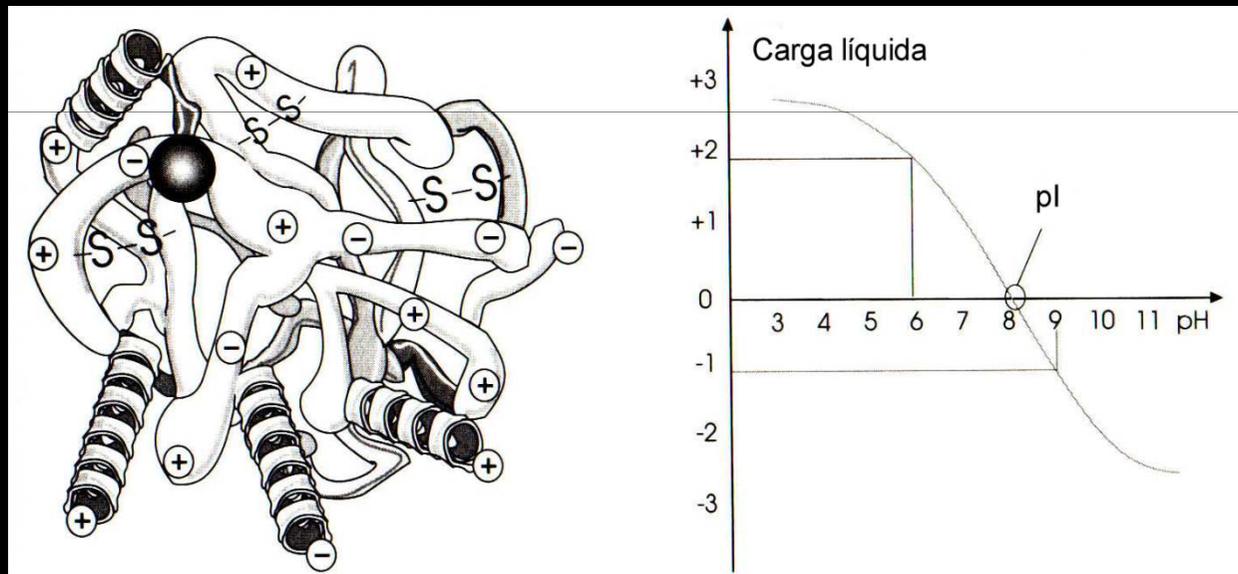
Western Blotting

- Procedimento : a sequência
- 4º Separação das proteínas em gel, de acordo com:
 - i) Ponto Isoelétrico (pI) → **Isoelectrofocalização (IEF)**
 - ii) Peso molecular → **SDS PAGE**
 - iii) pI + Peso molecular \Leftrightarrow IEF + SDS PAGE
→ **SDS PAGE bidimensional (2D)**
 - iv) Reconhecimento dos alérgenos pelas IgE dos pacientes
→ **Western Blotting**

Western Blotting

- Procedimento : a sequência
- 4º Separação das proteínas em gel de acordo com
 - i) Ponto Isoelétrico (pI) → **Isoelectrofocalização (IEF)**

Fundamento



Influência do pH na carga líquida de uma molécula proteica.

Esta proteína apresenta:

→ predomínio de duas cargas positivas a pH = 6

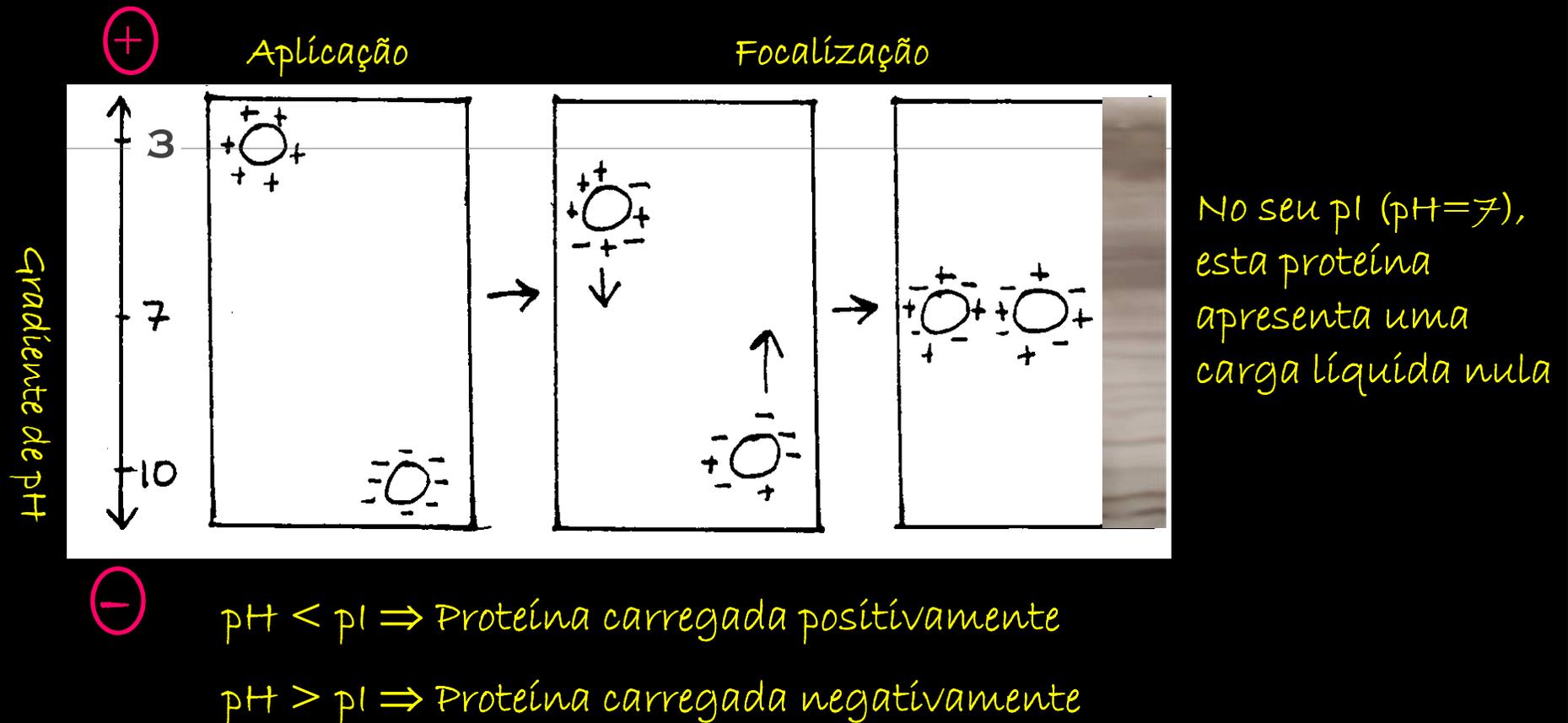
→ predomínio de uma carga negativa a pH = 9.

→ equilíbrio de cargas positivas e negativas (pI) ocorre a pH = 8.

Western Blotting

- Procedimento : a sequência
- Isoelectrofocalização (IEF)

Separação das proteínas em gel de gradiente de pH

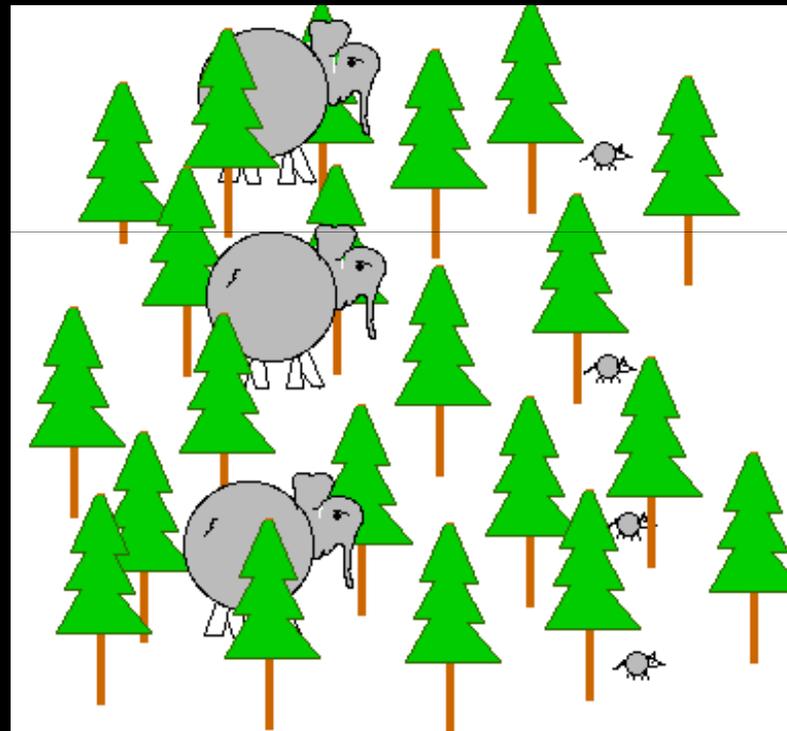


Western Blotting

- Procedimento : a sequência

ii) Peso molecular → **SDS PAGE**

Fundamento

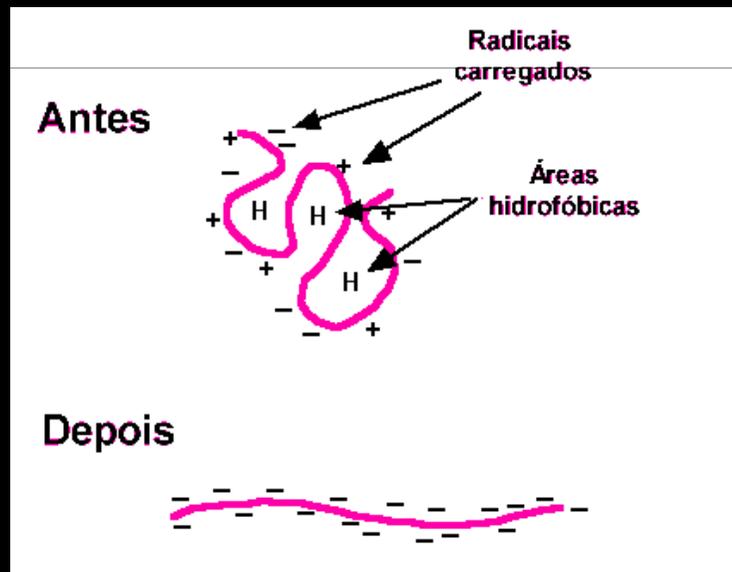


Migração competitiva em gel

Western Blotting

- Procedimento : a sequência

ii) Peso molecular → SDS PAGE



Tratamento desnaturante prévio

Aplicação da amostra

Proteínas em fase de separação

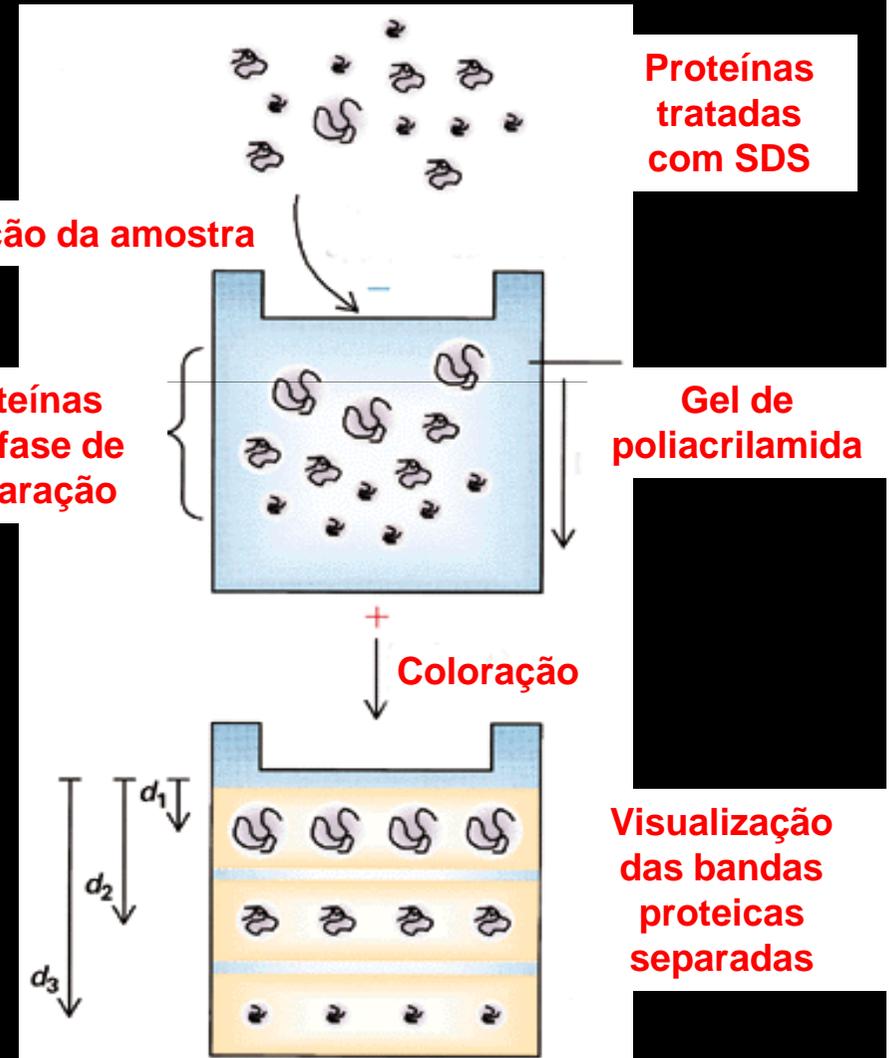
Proteínas tratadas com SDS

Gel de poliacrilamida

Coloração

Visualização das bandas proteicas separadas

d_1
 d_2
 d_3



Western Blotting

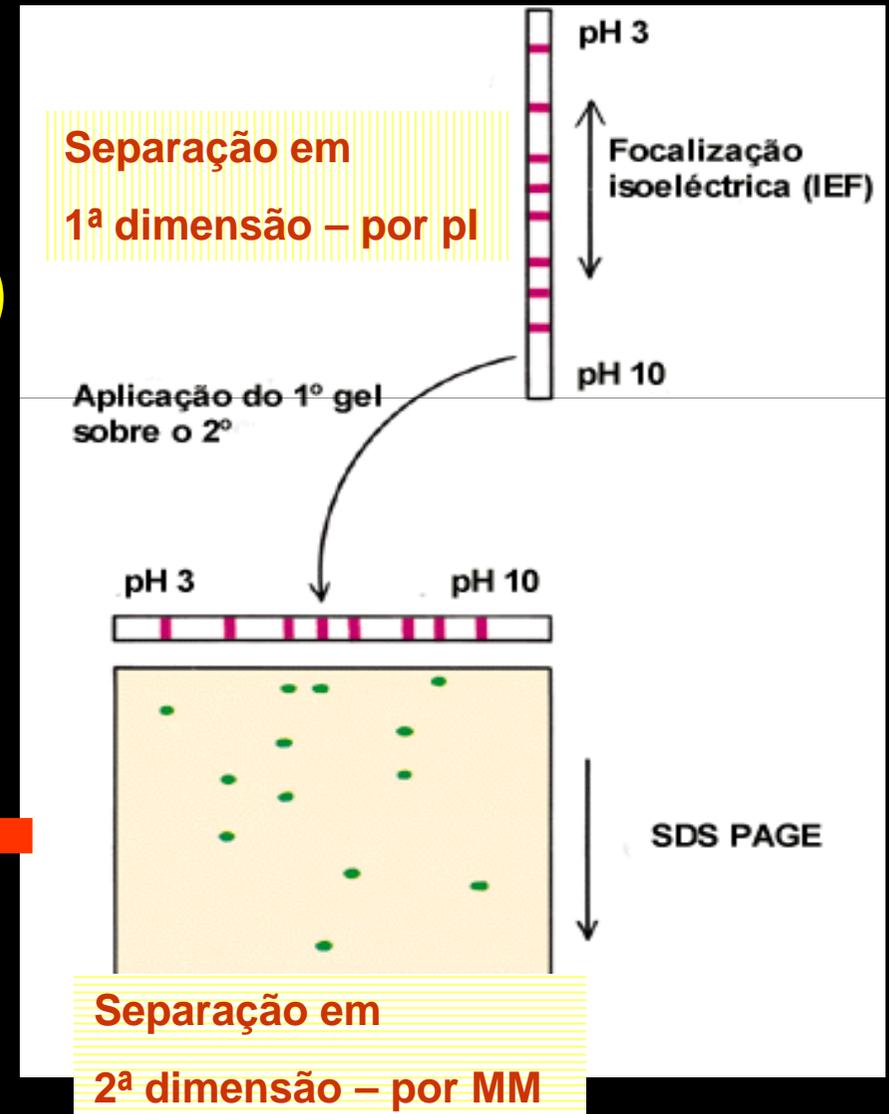
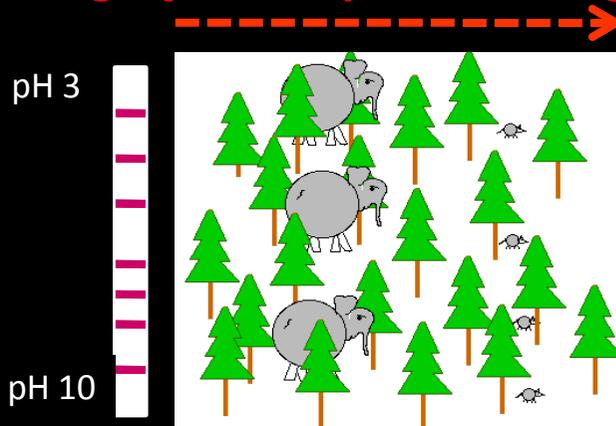
- Procedimento : a sequência

iii) pI + Massa molecular

⇔ IEF + SDS PAGE

SDS PAGE bidimensional (2D)

Migração competitiva em gel



Western Blotting

- Procedimento : a sequência

iv) Reconhecimento dos alérgenos pelas IgE dos pacientes

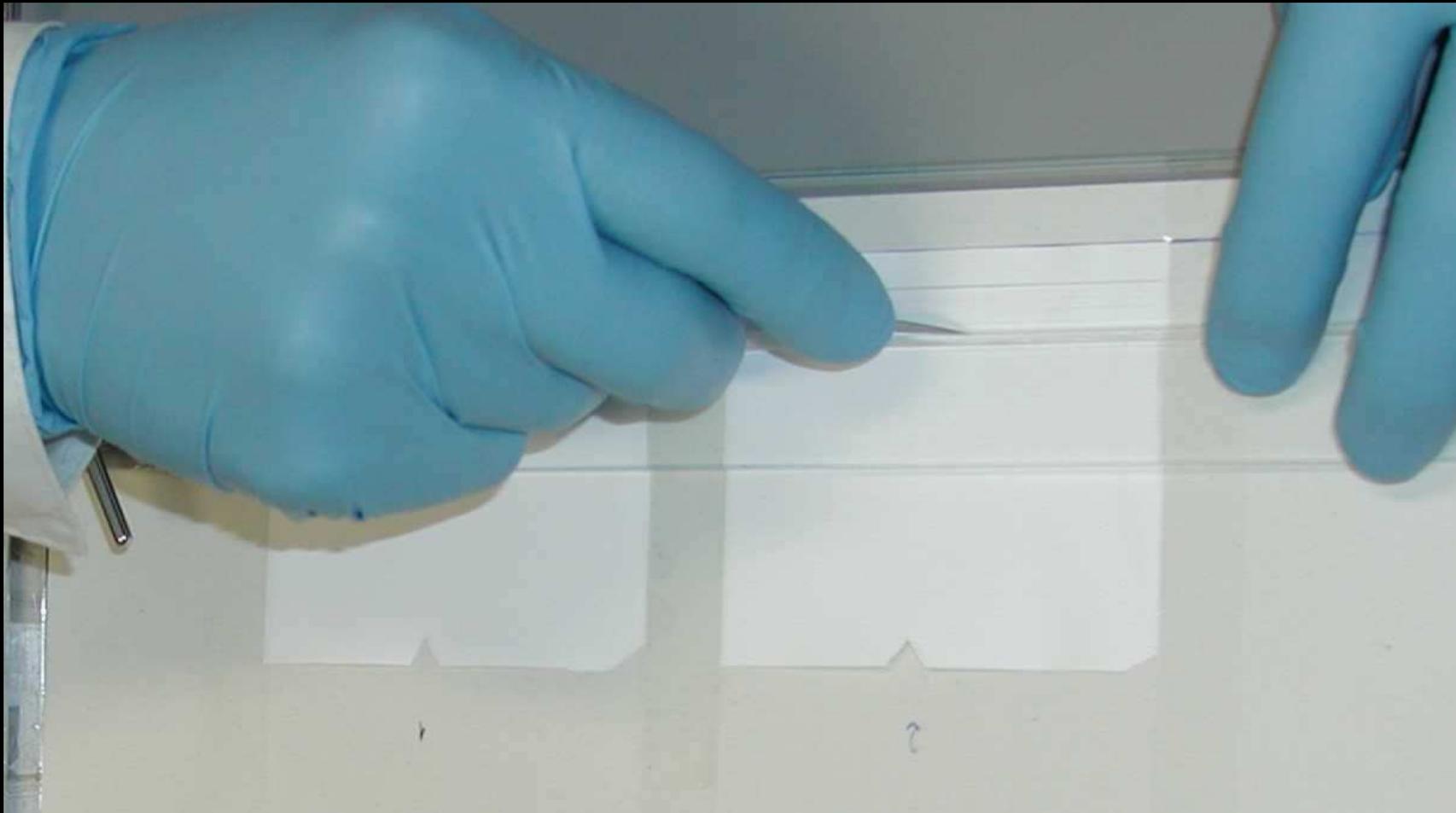
Western Blotting

1. Transferência das proteínas separadas para membrana de fixação (Blot)
2. Imuno-reconhecimento (Western Blotting)
3. Identificação dos alérgenos por revelação das IgE reconhecedoras dos alérgenos separados

Western Blotting

- Procedimento : a sequência

Corte da membrana de Blot em tiras perpendiculares à separação



Western Blotting

- Procedimento : a sequência

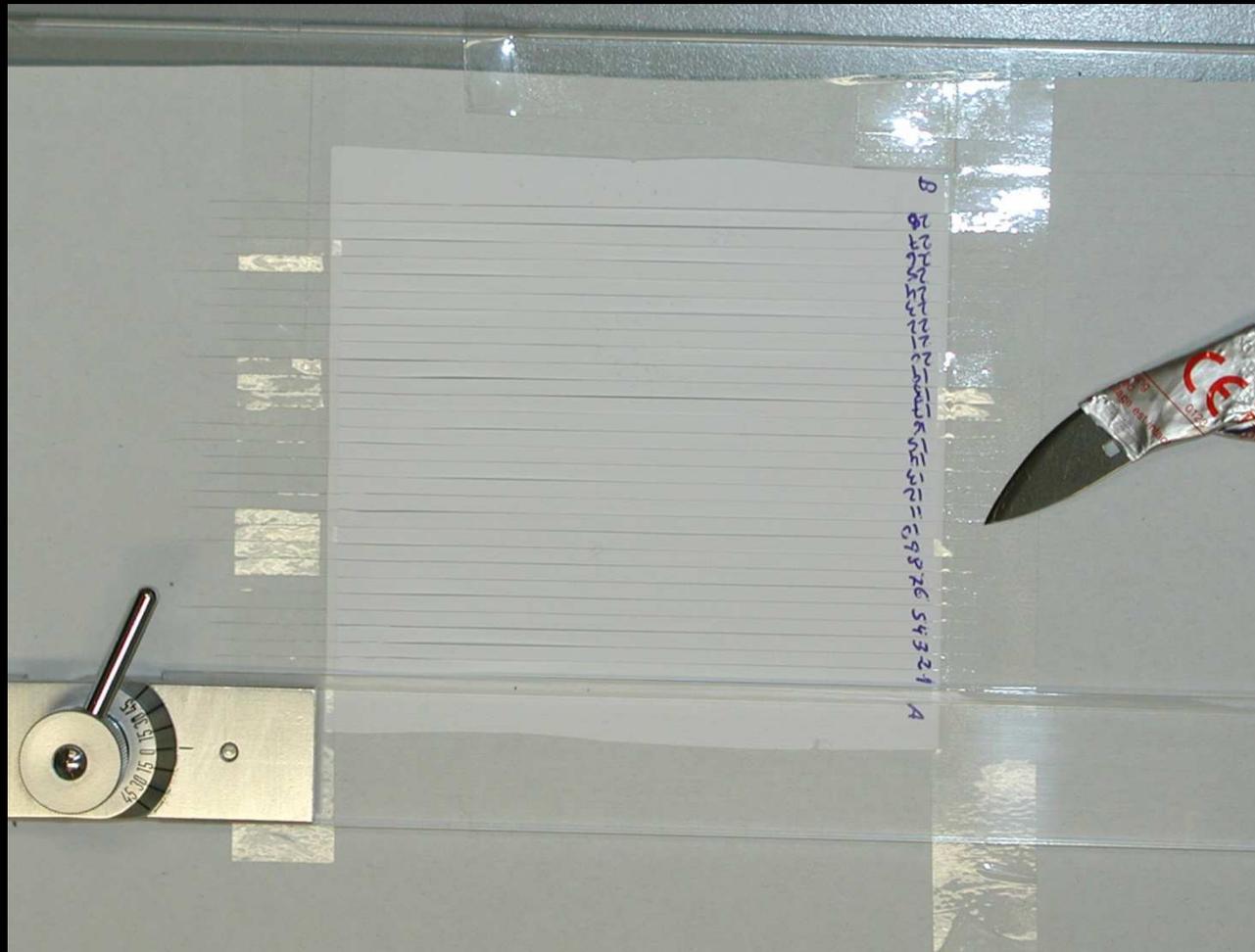
Numeração das tiras



Western Blotting

- Procedimento : a sequência

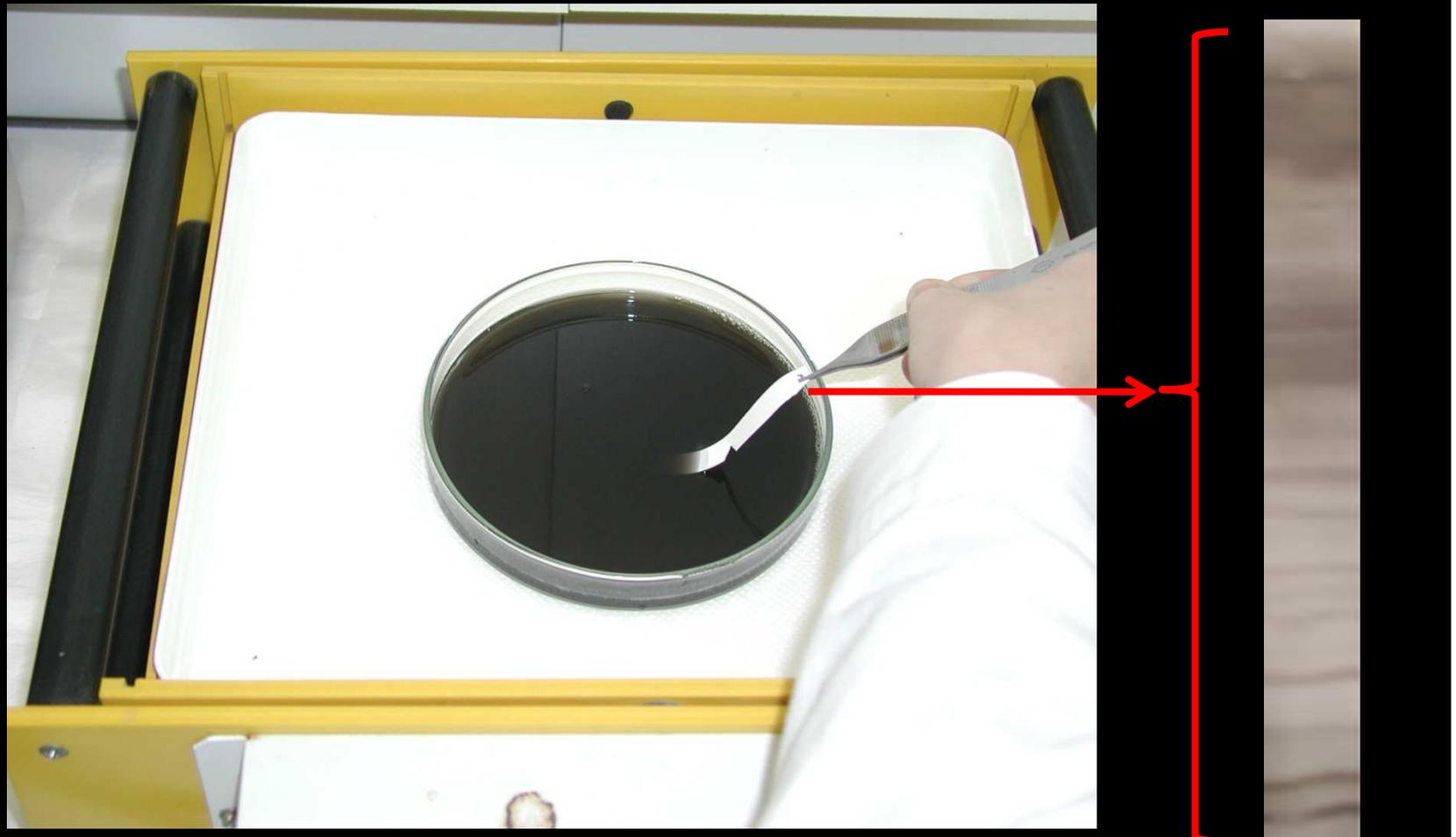
Tiras numeradas



Western Blotting

- Procedimento : a sequência

Controlo da transferência



Western Blotting

- Procedimento : a sequência

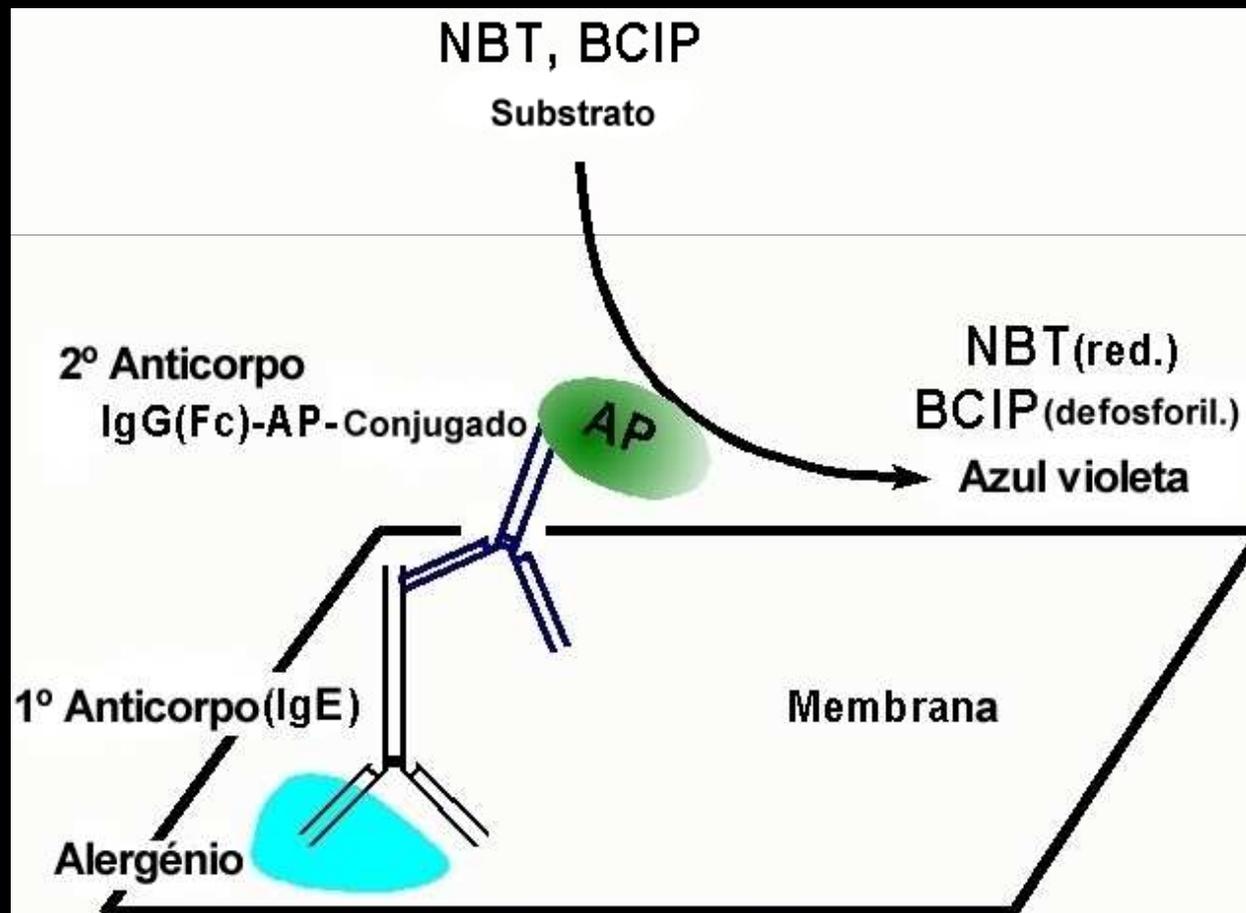
Imuno-reconhecimento (Western Blotting)



Western Blotting

- Procedimento : a sequência

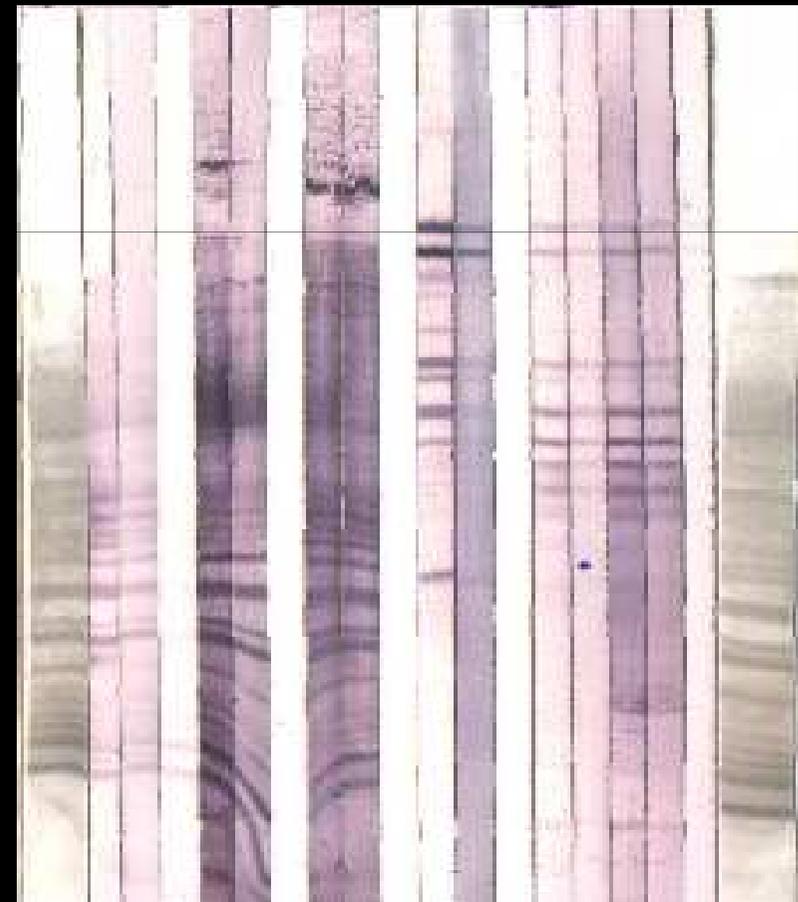
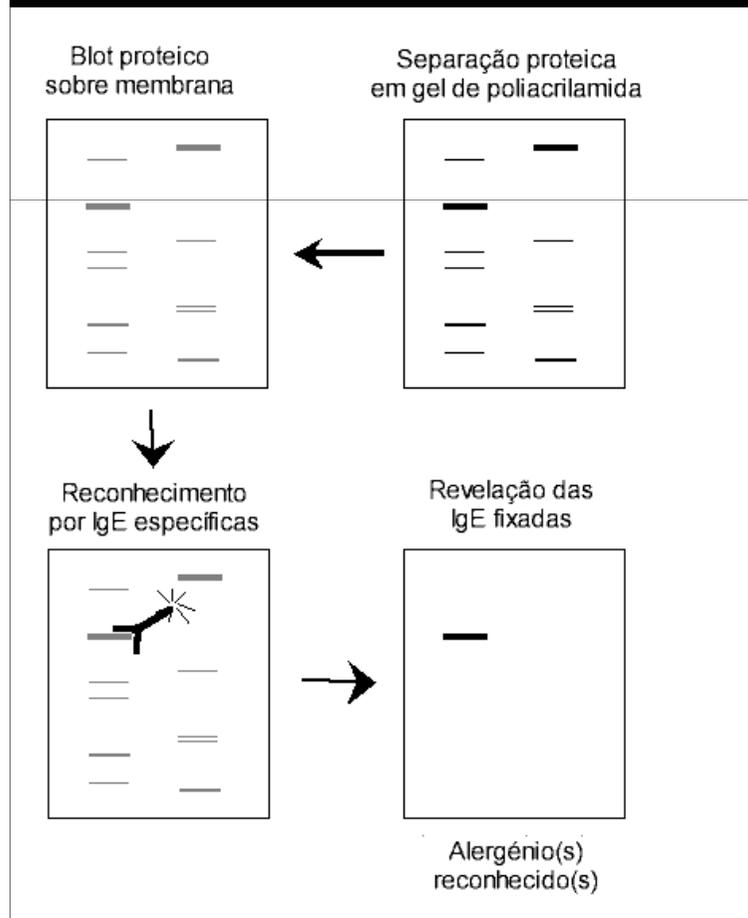
Imuno-reconhecimento (Western Blotting)



Western Blotting

- Procedimento : a sequência

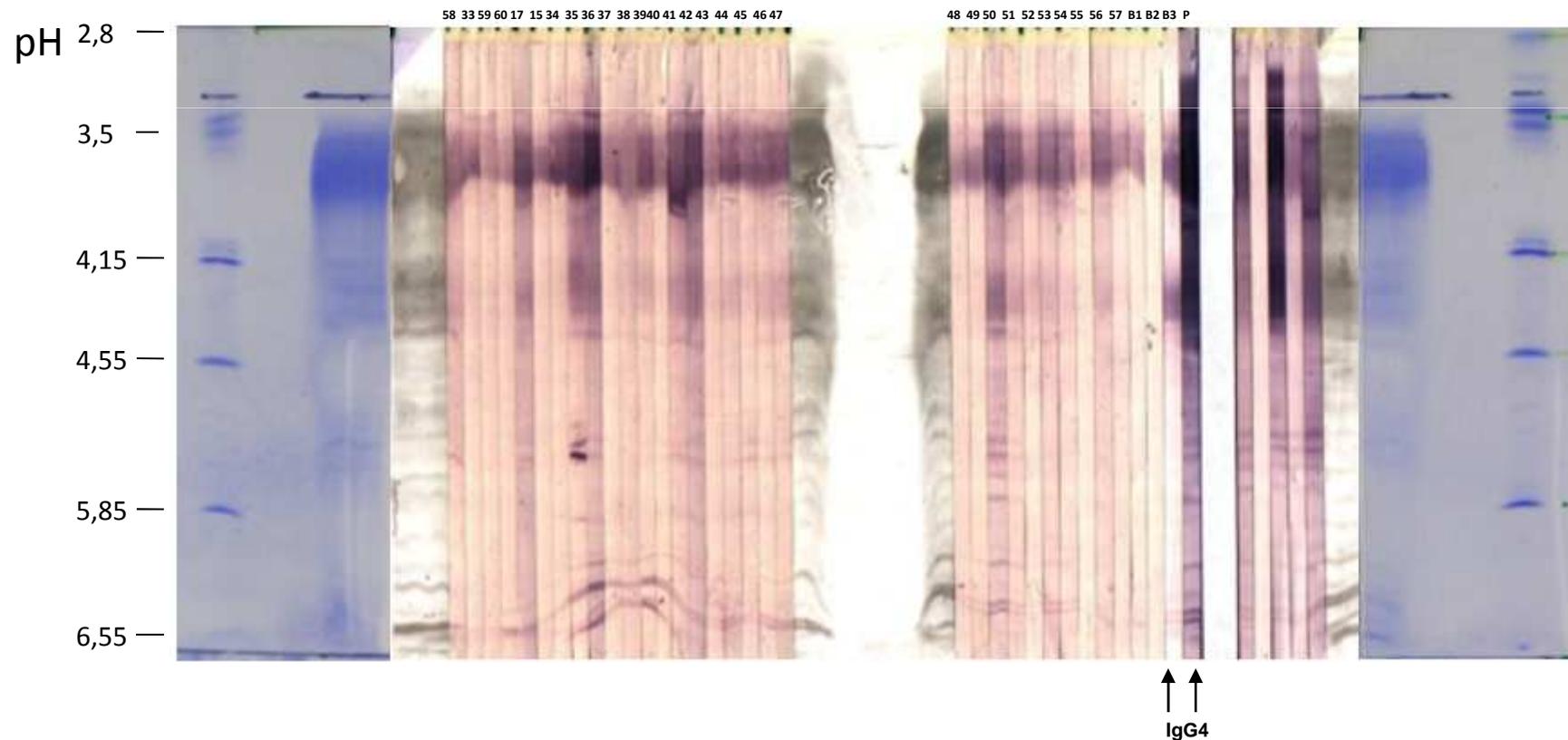
Imuno-reconhecimento (Western Blotting)



Western Blotting

- Procedimento : a sequência

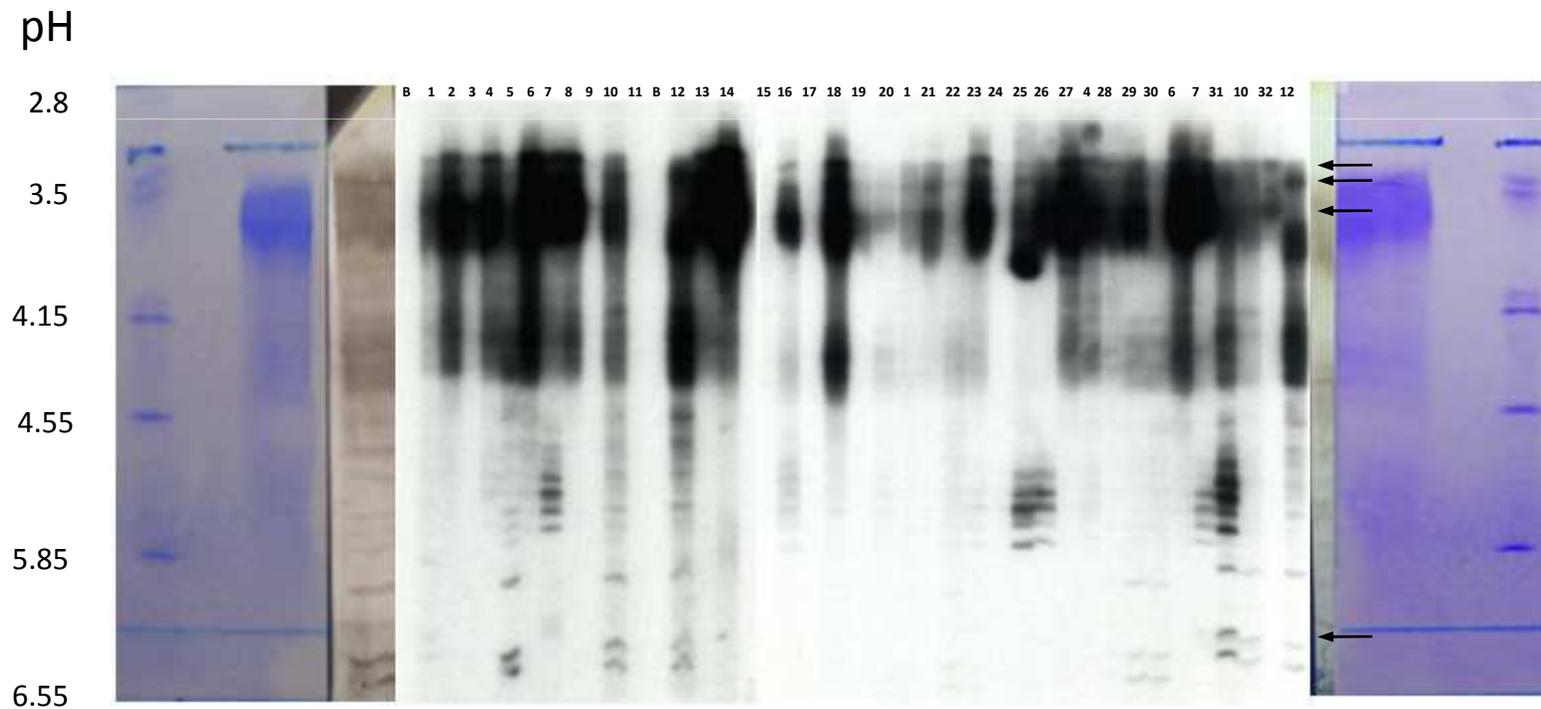
Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 1D (IEF)



Western Blotting

- Procedimento : a sequência

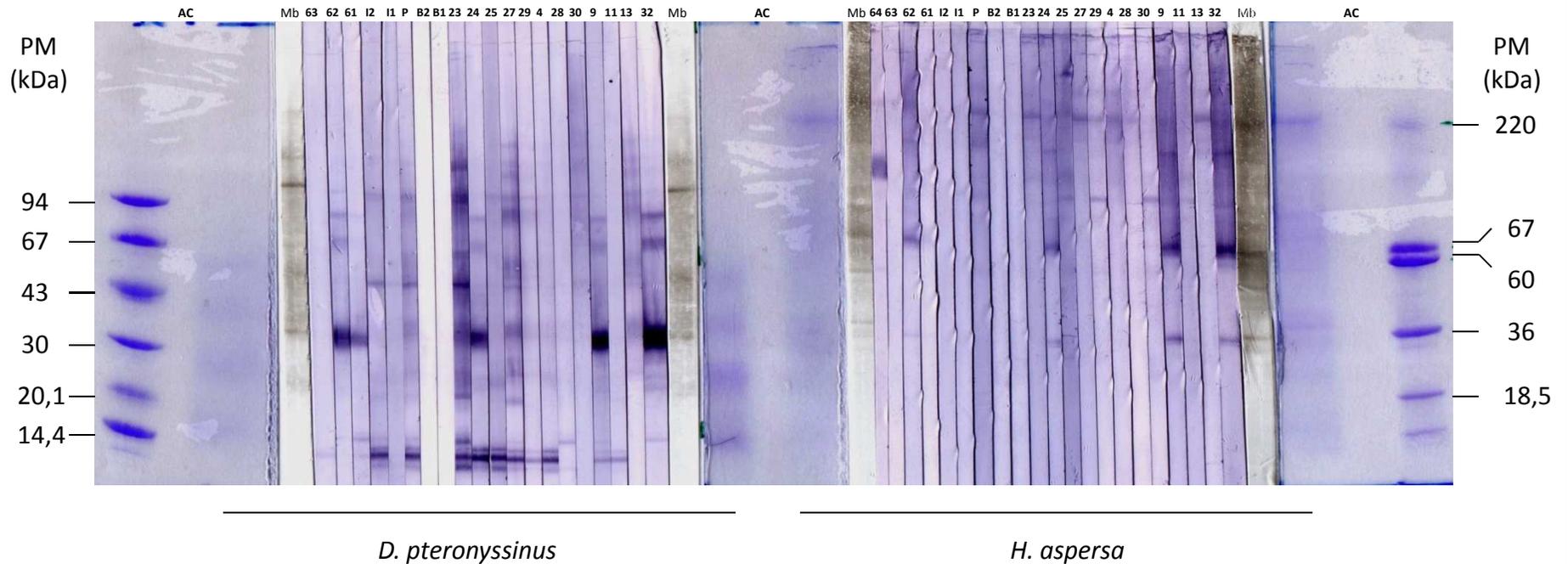
Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 1D (IEF)



Western Blotting

- Procedimento : a sequência

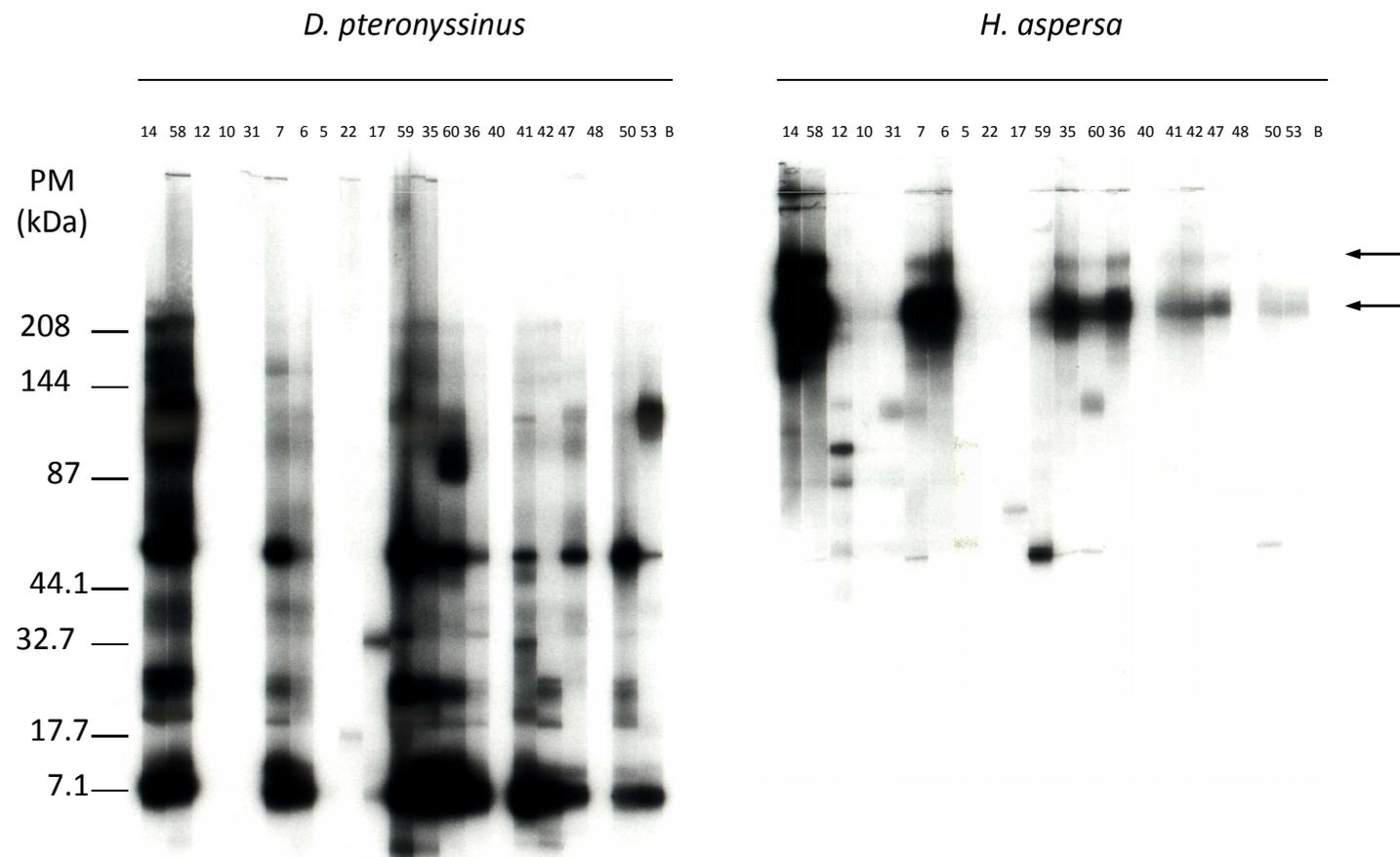
Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 1D (SDS PAGE)



Western Blotting

- Procedimento : a sequência

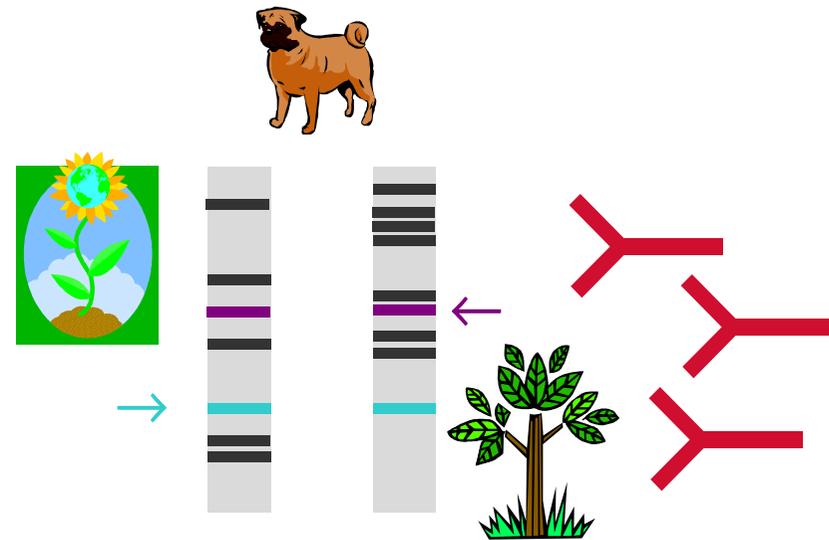
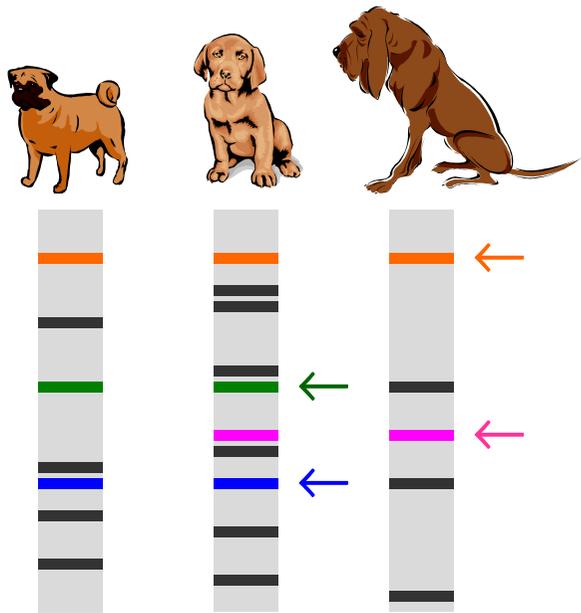
Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 1D (SDS PAGE)



Western Blotting

Imuno-reconhecimento / Western Blotting

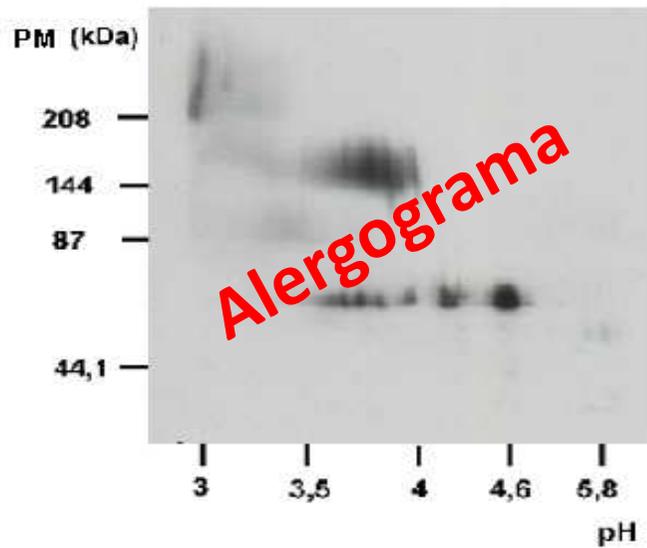
Espectrotipos



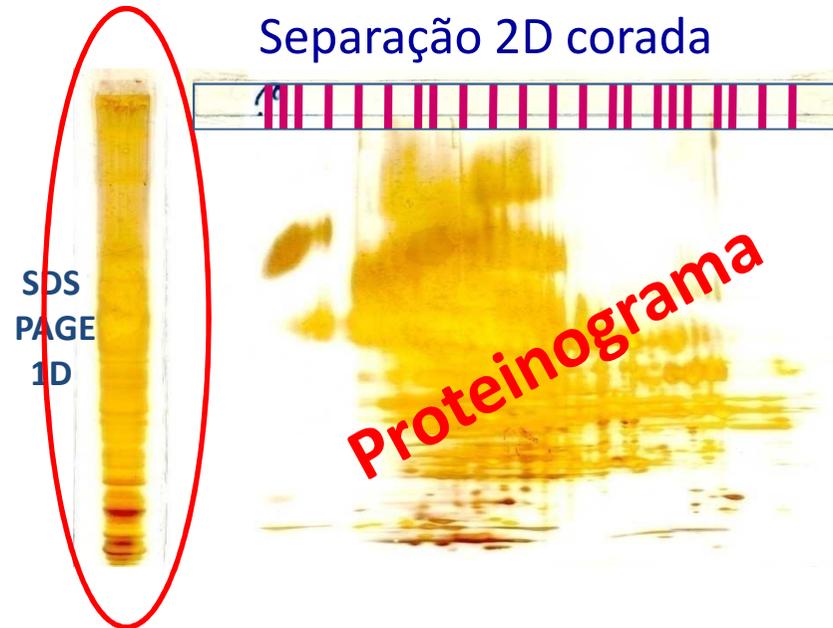
Western Blotting

Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 2D (IEF+SDS PAGE)

Western Blotting 2D



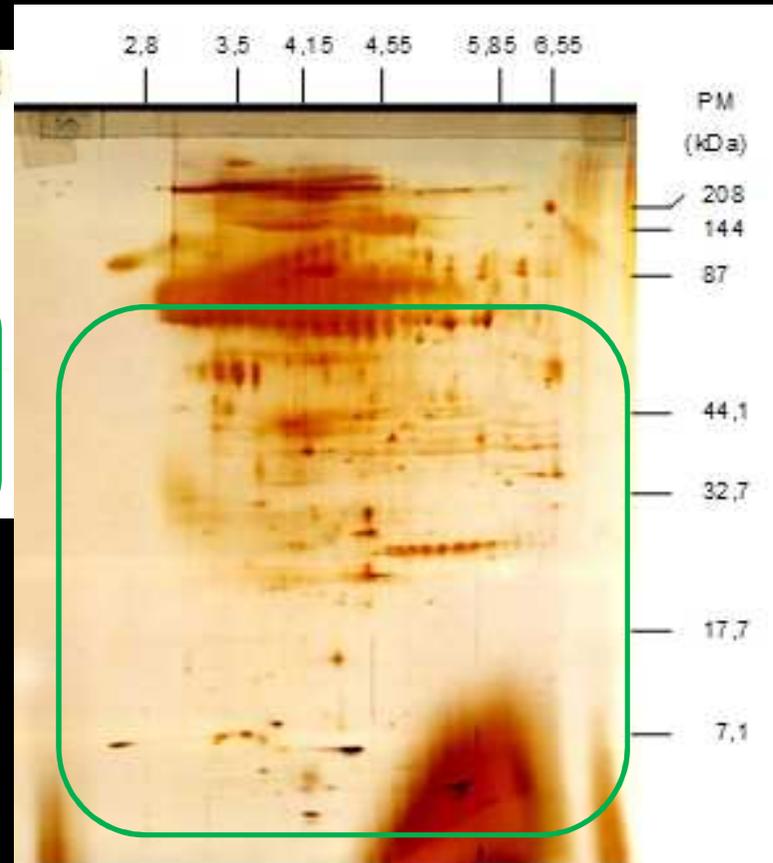
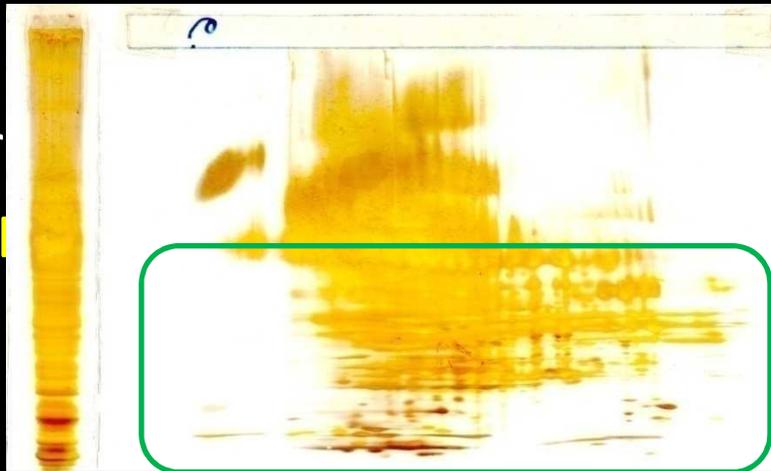
Separação 2D corada



Western Blotting

Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 2D (IEF+SDS PAGE)

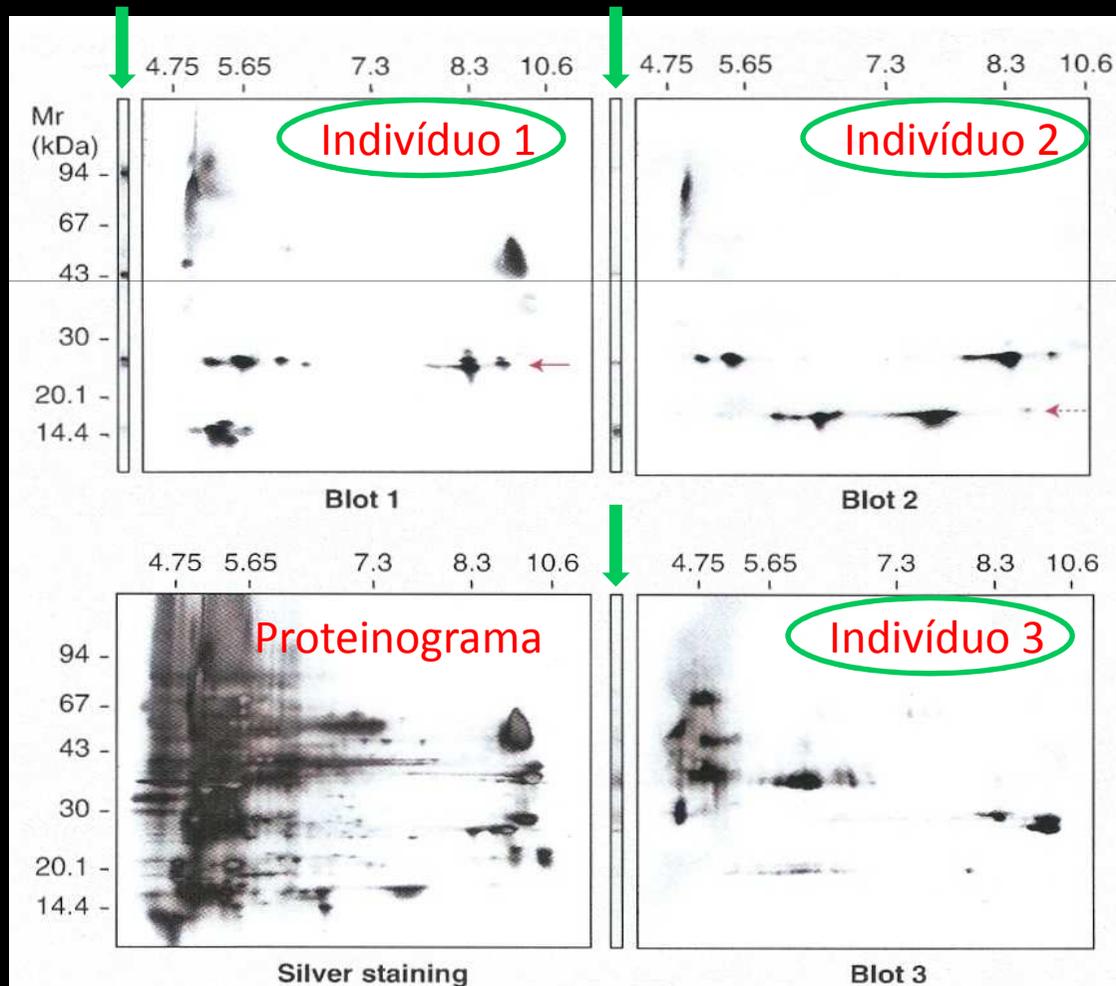
- Per
- | -



Western Blotting

Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 2D (IEF+SDS PAGE)

II - Diferenciar espectrotipos individuais próximos na 1D

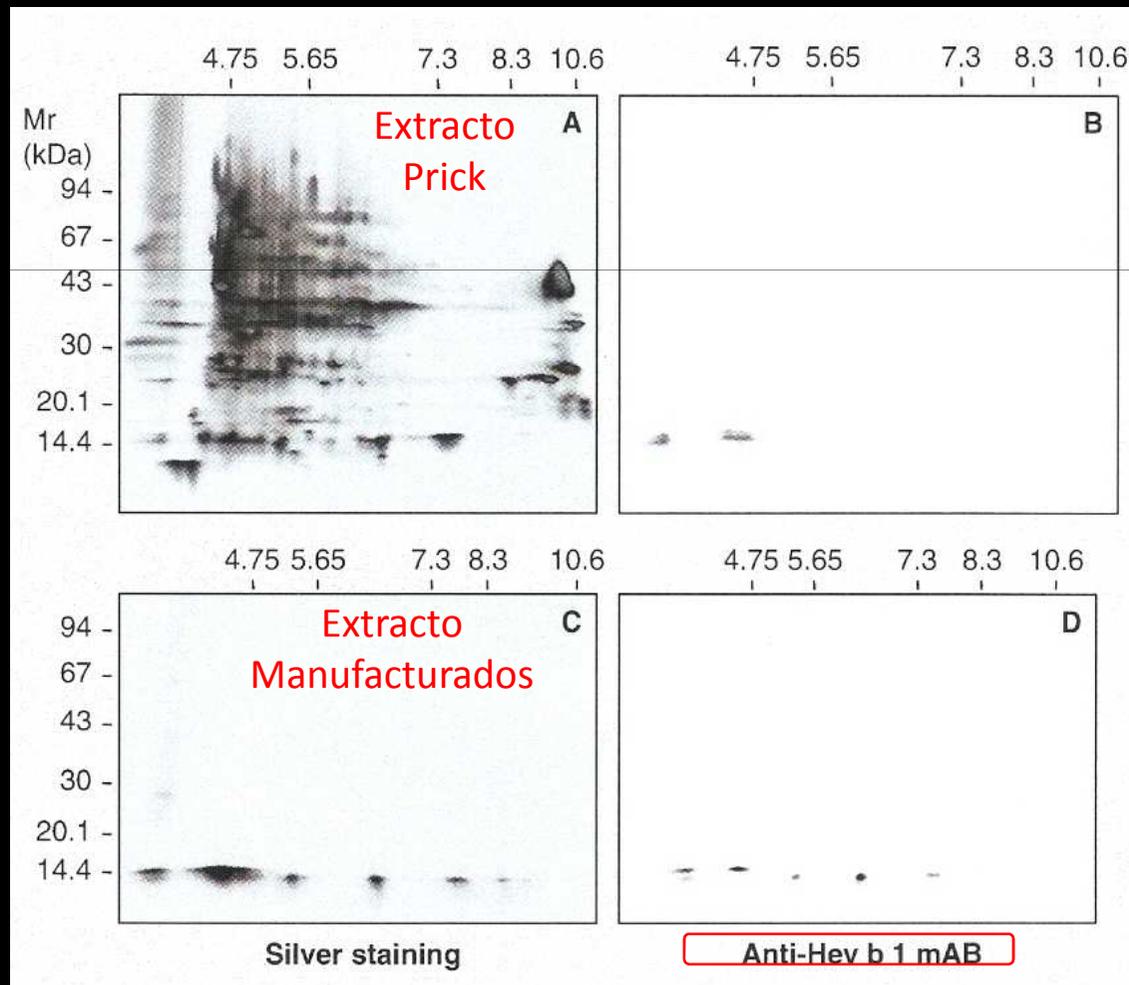


In Allergome: the characterization of allergens based on a 2D gel electrophoresis approach. Chardin H, Peltre G. Expert Rev. Proteomics (2005) 2(5): 757-765.

Western Blotting

Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 2D (IEF+SDS PAGE)

III - Relacionar expressão de alérgenos com o estado da fonte



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

Western Blotting

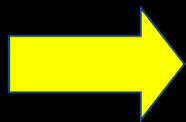
Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 2D (IEF+SDS PAGE)

- IV - Melhorar consideravelmente a identificação da pequena porção do proteoma constituída pelos alérgenos
- V - Relacionar comportamentos clínicos com reconhecimento molecular
- VI - Aprofundar a necessária relação entre diagnóstico *in vitro* e *in vivo*
- VII - Contribuir para a utilização de imunoterapia mais dirigida e eficaz
- VIII - Evoluir para Micro- ou Nanotecnologias, no princípio do reconhecimento da diversidade alérgica intra-específica
- IX - Melhorar consideravelmente o diagnóstico alérgológico, passo essencial para uma verdadeiramente eficaz terapia alérgeno-específica

Identificação de Reacções Cruzadas

- Sensibilização ao pó de alho \Rightarrow asma após ingestão
- Sensibilização a crustáceos por inalação dos vapores de cozedura \Rightarrow reacção anafiláctica após ingestão
- Sensibilização ao pólen do girassol \Rightarrow urticária após ingestão de mel de girassol
- Sensibilização ao ananás (bromelaína) \Rightarrow asma após ingestão
- Sensibilização a macrólidos (ex: espiramicina) \Rightarrow rinite após ingestão de ovos com resíduos

Identificação de Reacções Cruzadas



Componentes antigénicas comuns
entre fontes alergénicas diferentes

Partilha de epitopos comuns

Proximidade taxonómica

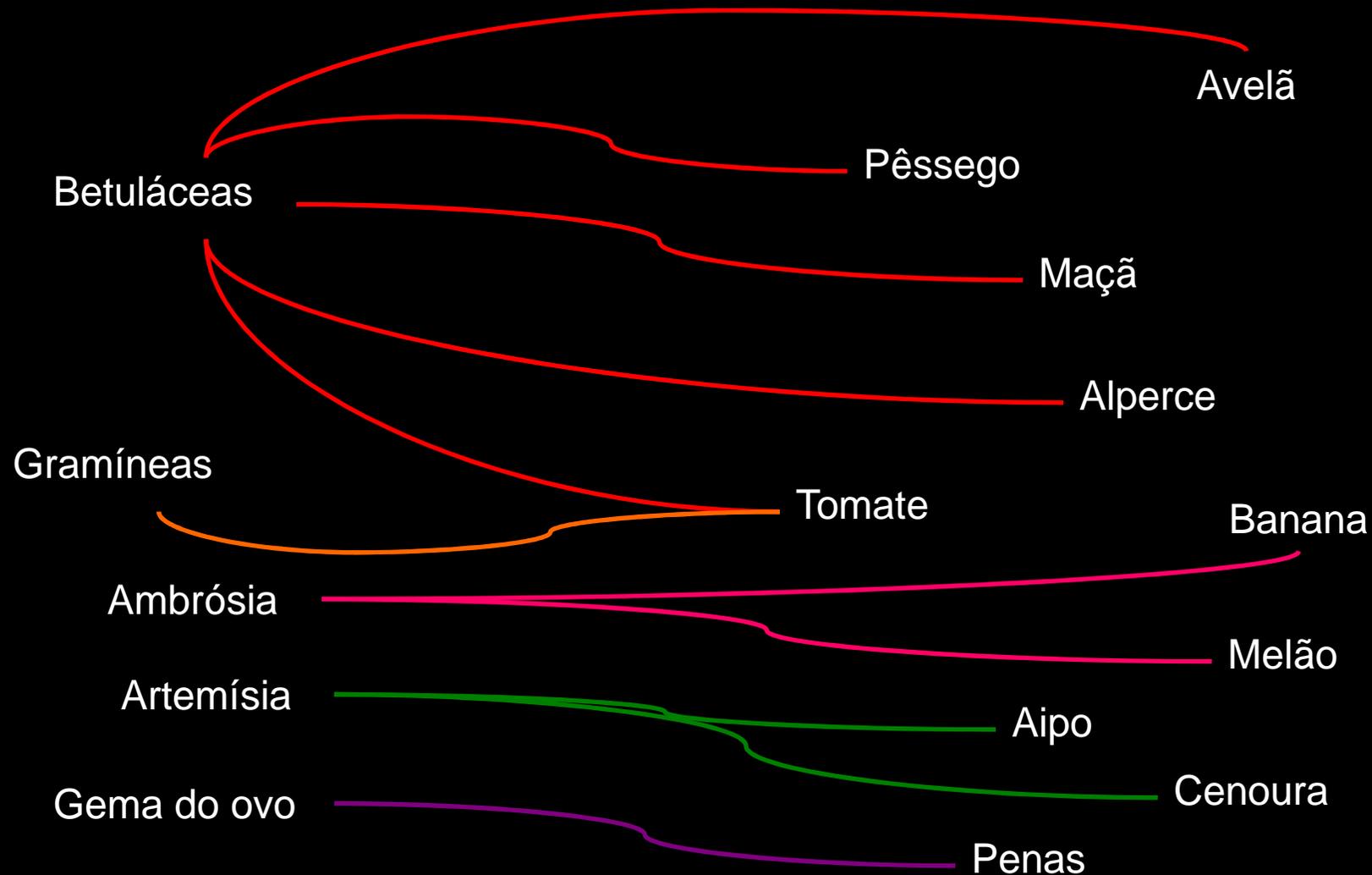
Diferentes espécies de:
Vespas, abelhas, ácaros, crustáceos, caracóis

Estruturas proteicas conservadas durante a evolução

Profilina: pólen da bétula / cenoura, batata, ...
Actinidina: Kiwi, banana, papaia, noz, ... / látex
Caracóis / ácaros

Identificação de Reacções Cruzadas

Exemplos de epitopos comuns partilhados por alimentos e partículas inaladas, provenientes de fontes não relacionadas:



Identificação de Reacções Cruzadas

Outras reacções cruzadas:

Com o látex

- Castanha
- Espinafres
- Kiwi
- Noz
- Banana
- Melão

Com ácaros

- Caracóis

Entre diversas espécies de

- Caracóis
- Crustáceos

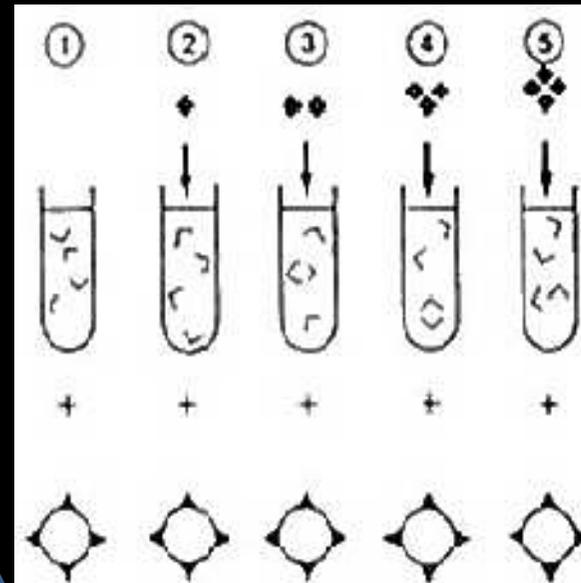
Entre amendoim e tremoço

Identificação de Reacções Cruzadas

1º Incubação prévia dos soros a testar com o **extracto da fonte alergénica A (Inibidora)**

2º RAST de Inibição com a **fonte alergénica B**

Inibição do RAST



Extracto inibidor da fonte A
em concentrações crescentes

+
Soro do animal alérgico



RAST para a fonte B

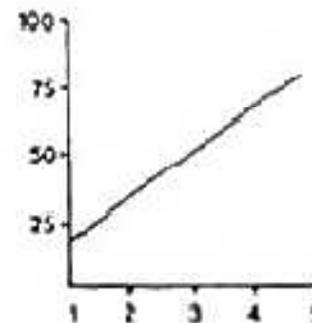
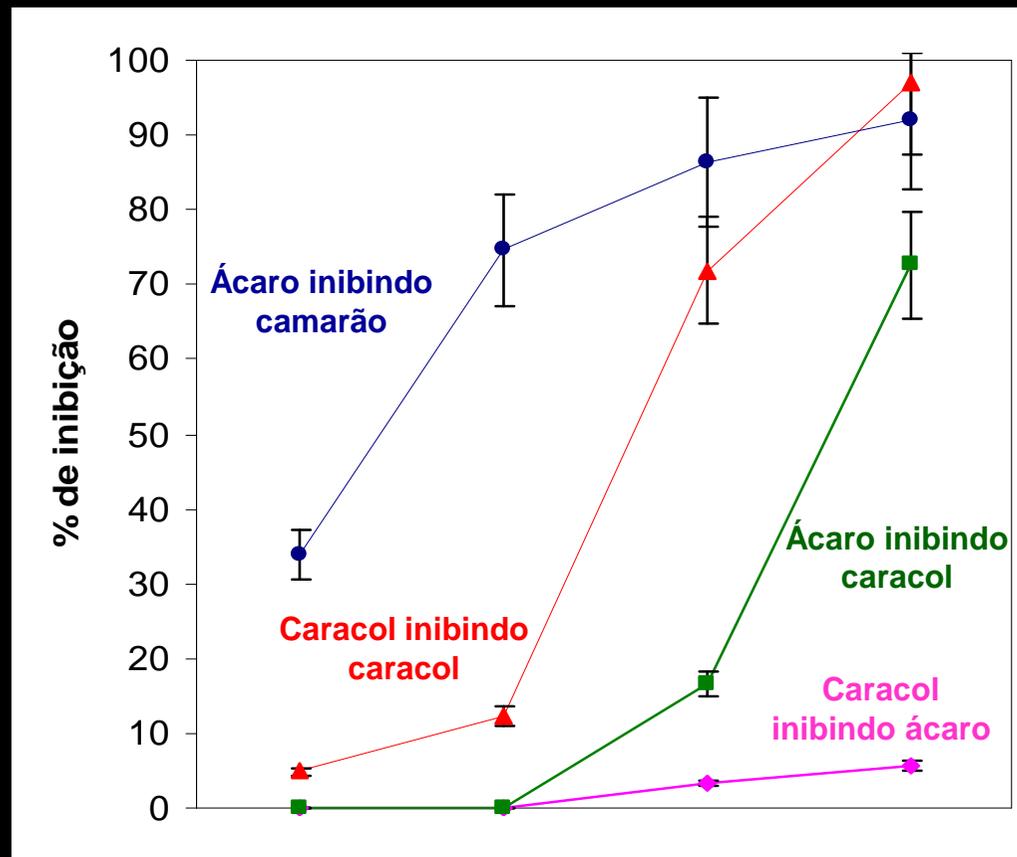


Gráfico de inibição

Identificação de Reacções Cruzadas

Exemplos práticos:

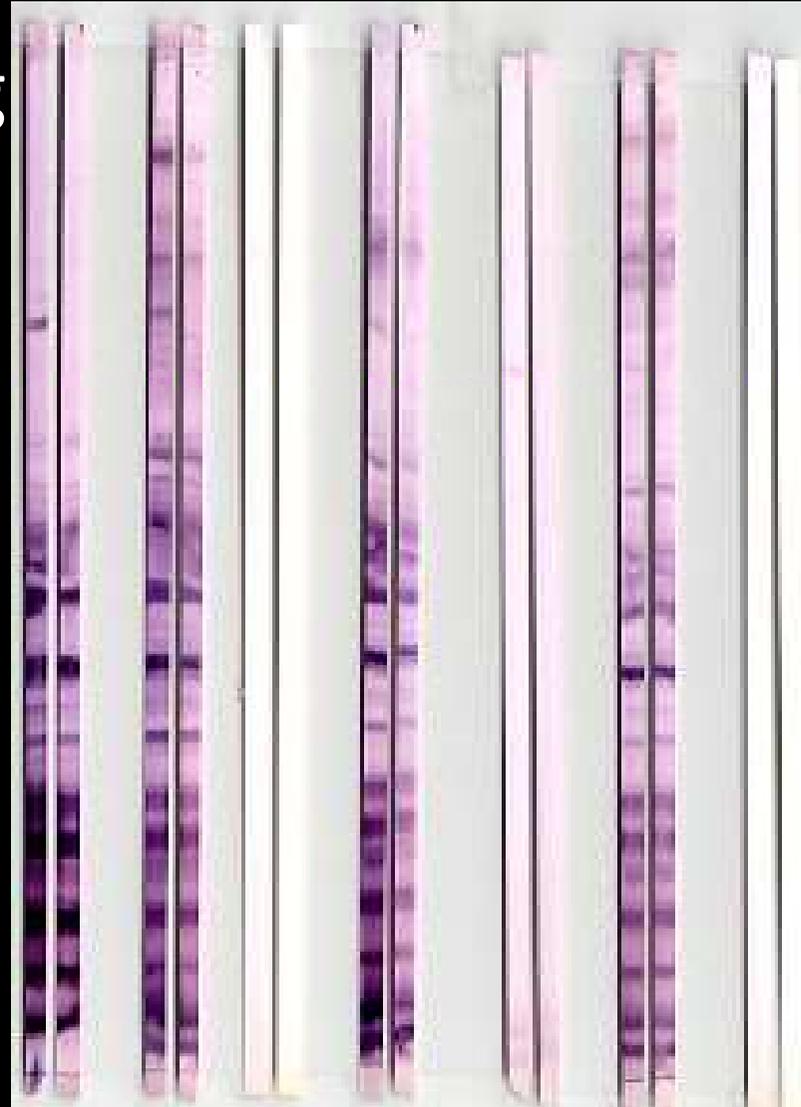


Identificação de Reacções Cruzadas

... Inibição do W. Blotting

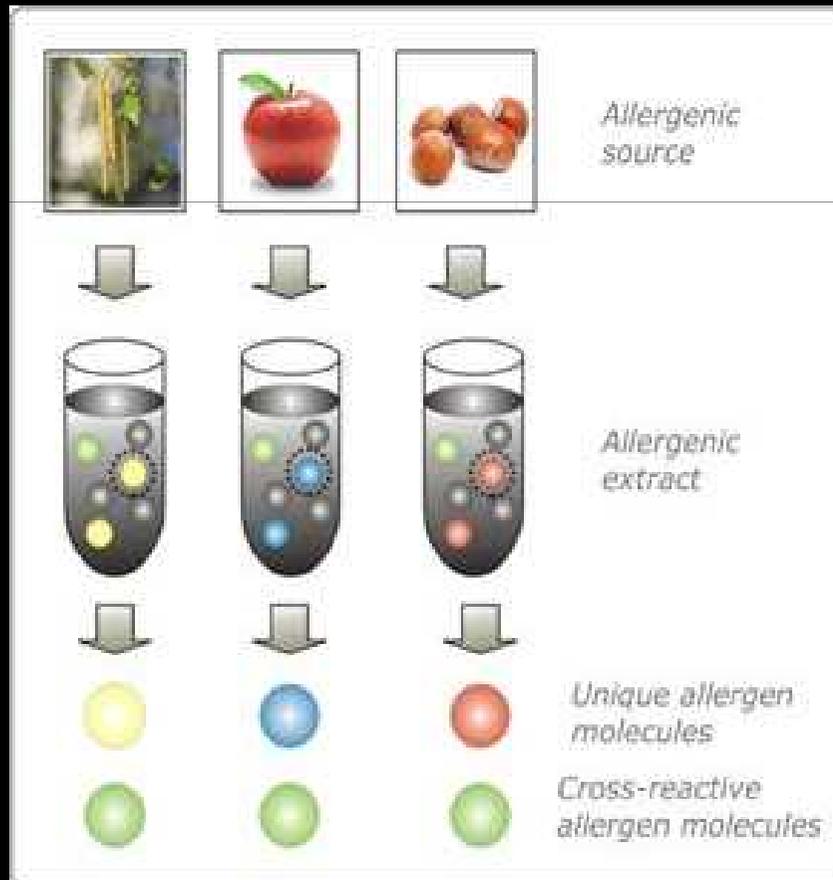
Inibição do W. Blotting
do *Phl p* pela *Bet v*

Inibição do *Kiwi* pelo *Phl p*



Microarrays e CRD

- **ISAC** (Immuno Solid-phase Allergy Chip) – Phadia, Suécia

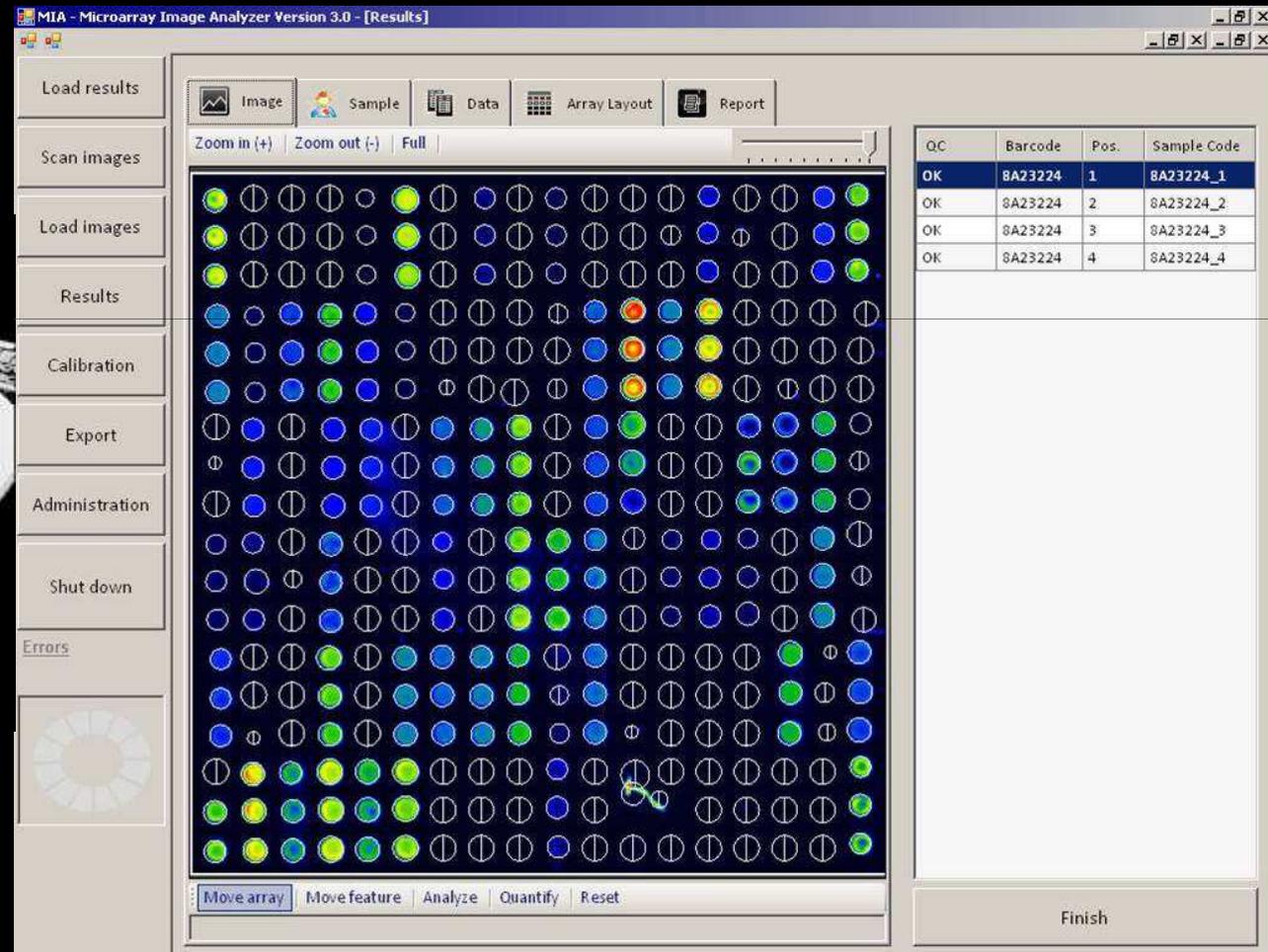
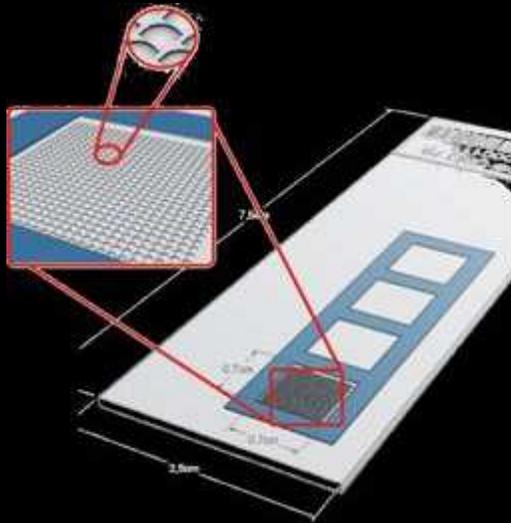


Permite:

Detectar IgE específicas
para 103 alérgenos
recombinantes diferentes
num só ensaio e com
apenas 20 μL soro

Microarrays e CRD

- ISAC (Immuno Solid-phase Allergy Chip)



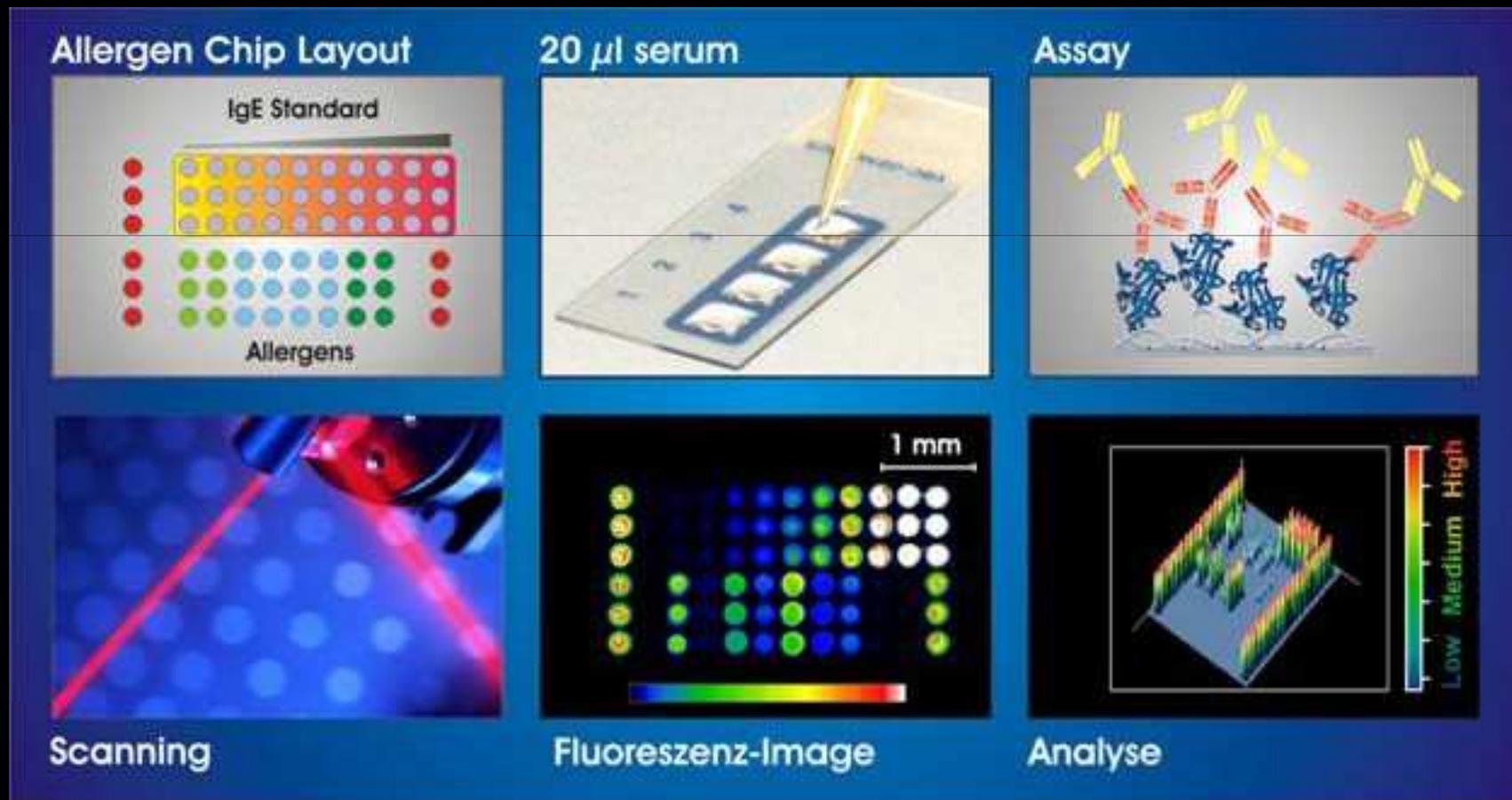
The screenshot shows the MIA - Microarray Image Analyzer Version 3.0 - [Results] software interface. The window title is "MIA - Microarray Image Analyzer Version 3.0 - [Results]". The interface includes a menu bar with "Image", "Sample", "Data", "Array Layout", and "Report". Below the menu bar are zoom controls: "Zoom in (+)", "Zoom out (-)", and "Full". The main display area shows a grid of colored circles representing the microarray results. The colors range from blue to red, indicating different intensity levels. A mouse cursor is visible over the grid. On the left side, there is a vertical toolbar with buttons for "Load results", "Scan images", "Load images", "Results", "Calibration", "Export", "Administration", "Shut down", and "Errors". At the bottom of the toolbar is a circular icon. Below the main display area, there are buttons for "Move array", "Move feature", "Analyze", "Quantify", and "Reset". On the right side, there is a table with the following data:

QC	Barcode	Pos.	Sample Code
OK	8A23224	1	8A23224_1
OK	8A23224	2	8A23224_2
OK	8A23224	3	8A23224_3
OK	8A23224	4	8A23224_4

At the bottom right of the window, there is a "Finish" button.

Microarrays e CRD

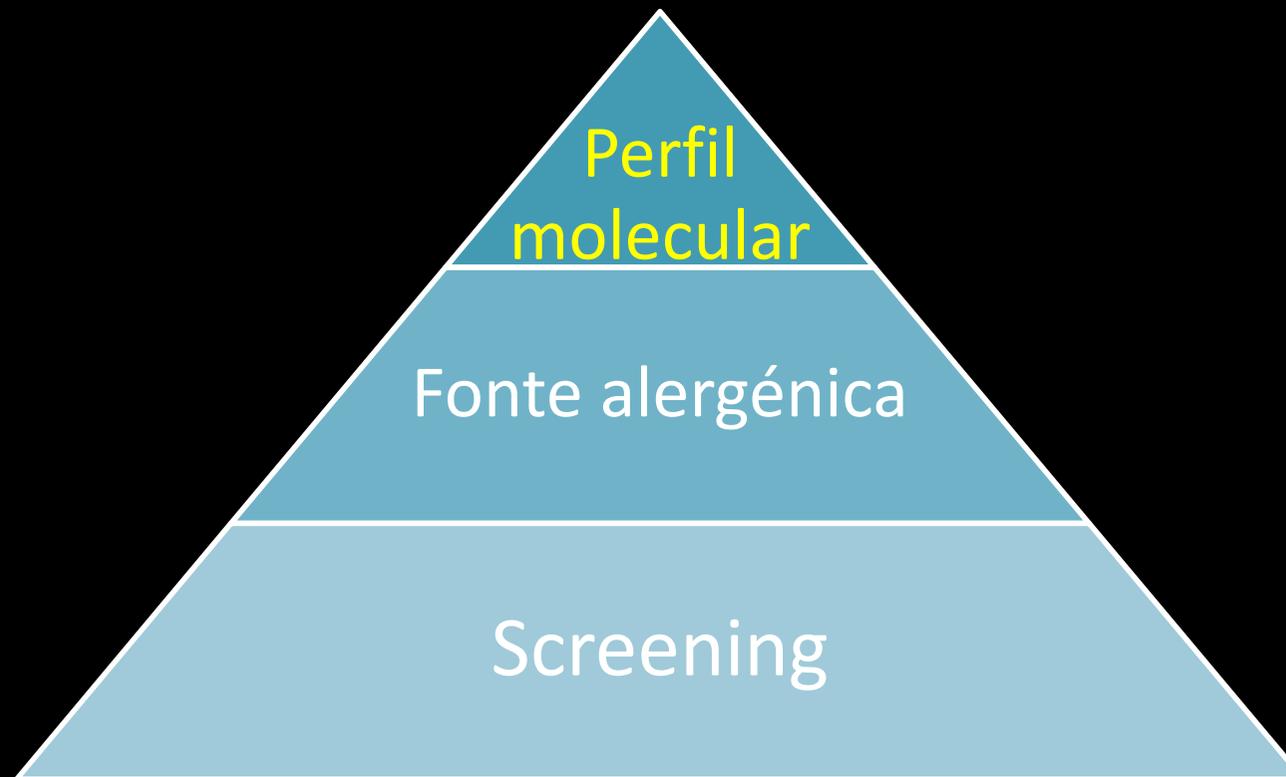
- ISAC (Immuno Solid-phase Allergy Chip)



Microarrays e CRD

- Níveis no diagnóstico IgE:

CRD (Component Resolved Diagnosis)



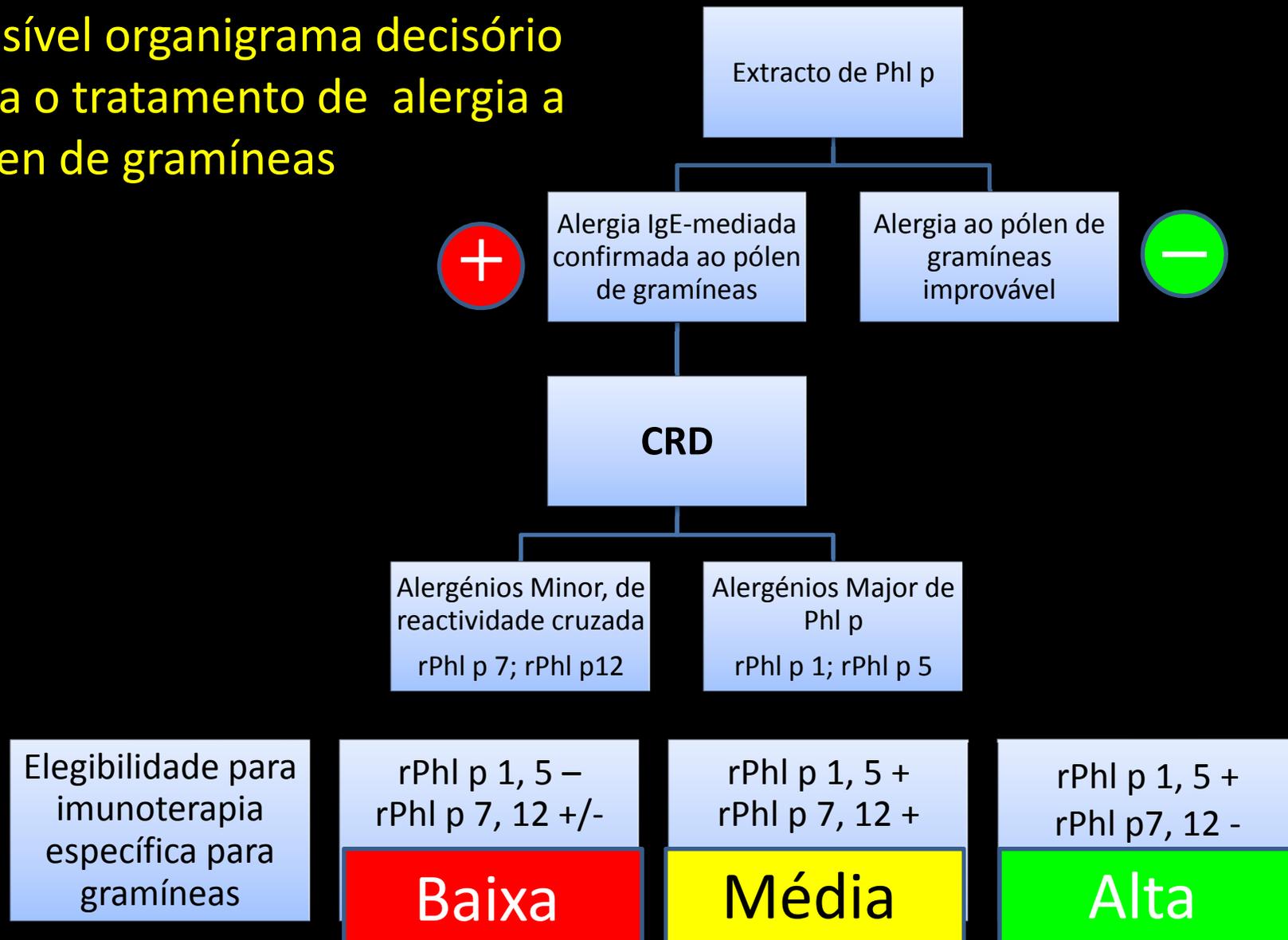
Microarrays e CRD

CRD (Component Resolved Diagnosis)

- Maior sensibilidade dos testes
- Diagnóstico diferencial
- Melhor selecção dos pacientes para imunoterapia
- Imunoterapia à medida...
- Previsão de reactividade cruzada
- Prognóstico
- Futuro

CRD (Component Resolved Diagnosis)

Possível organigrama decisório para o tratamento de alergia a pólen de gramíneas



Métodos Laboratoriais

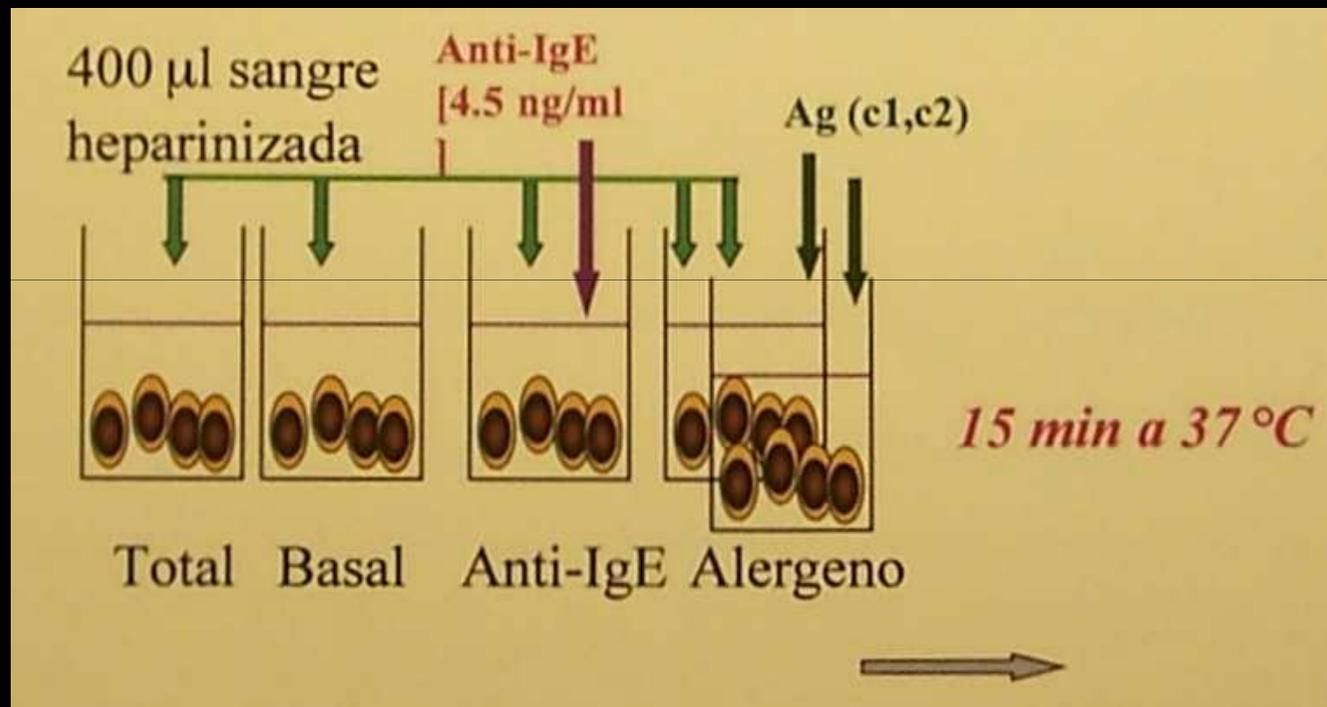
Imunidade Celular

Teste de libertação de histamina

- Quantificação da libertação de histamina dos basófilos
→ Estudo *in vitro* de reacções de hipersensibilidade imediata
- A partir do sangue total (basófilos têm o exclusivo da histamina no sangue periférico)
- Reproduz *in vitro* a reacção alérgica
→ prova de provocação *in vitro*
- Pequeno volume de sangue requerido ($\cong 0,6 - 1\text{mL}$)
→ Método de Fluorimunoensaio capaz de detectar
0,5 a $>100\text{ ng/mL}$

Teste de libertação de histamina

Fase de estimulação



Resultado: % LH induzida pelo antigénio testado

Teste de libertação de histamina

Indicações e vantagens

	Sensibilidade	Especificidade
Alergia a inalantes		
Ácaros	87%	84%
Fungos	90%	86%
Alergia alimentar	56%	78%
Conjuntivite alérgica	Elevada	Elevada
Alergia a fármacos	51%	63%

Teste de libertação de histamina

- Rapidez de realização
- Complementar de métodos como o doseamento de IgE específicas
- Permite avaliar a resposta a alérgenos para os quais não está disponível a determinação da IgE específica
- Permite avaliar o efeito da terapêutica farmacológica, quer *in vitro*, quer *in vivo*
- Útil para diagnóstico em pacientes com alterações cutâneas que impossibilitam a realização das provas cutâneas

TTL (Teste de transformação linfocitária)

- Linfócitos anteriormente sensibilizados sofrem regressão blástica e proliferam quando expostos, de novo, a esse estímulo antigénico
- Cultura de linfócitos em presença dos antígenos suspeitos
- Avaliação da blastogénese proliferante pela incorporação de ^3H -timidina
- Vasto campo de aplicação

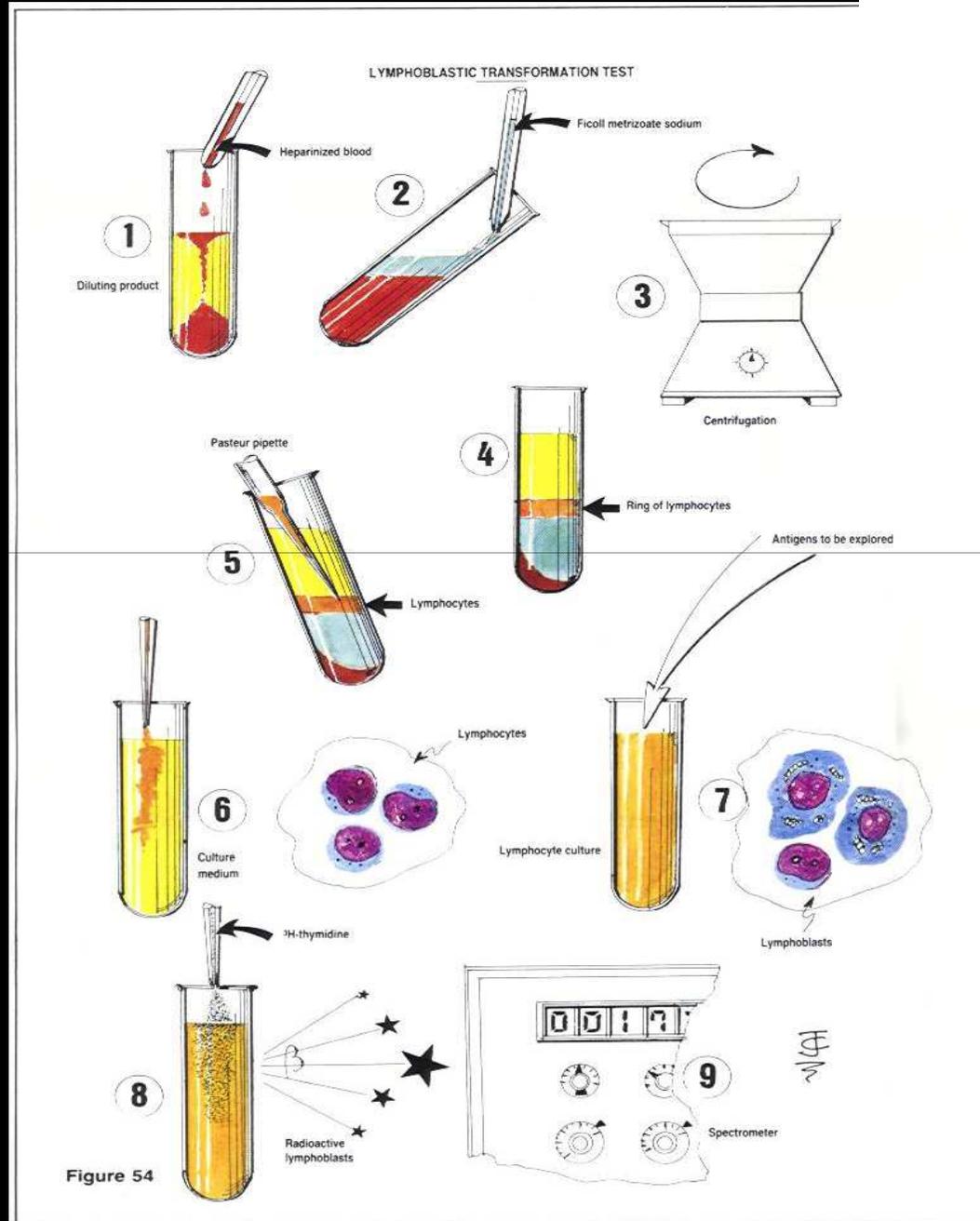


Figure 54

TTL (Teste de transformação linfocitária)

- Resultado expresso em CPM das culturas celulares obtidas
 $IE = \text{CPM células estimuladas} / \text{CPM células não estimuladas}$
- $IE > 3 \Rightarrow$ Positivo
- Vantagem: > sensibilidade que outros testes de avaliação da hipersensibilidade a fármacos
- Desvantagem: fraca correlação com a clínica

Imunofenotipagem

- Identificação e caracterização de células em suspensão, de acordo com:

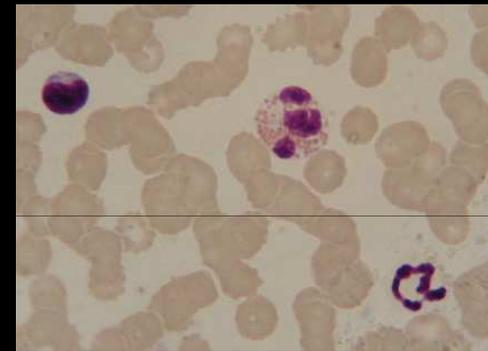
Dimensão

Complexidade ou granularidade celular

Expressão molecular (à superfície e interna)

Sem estimulação prévia

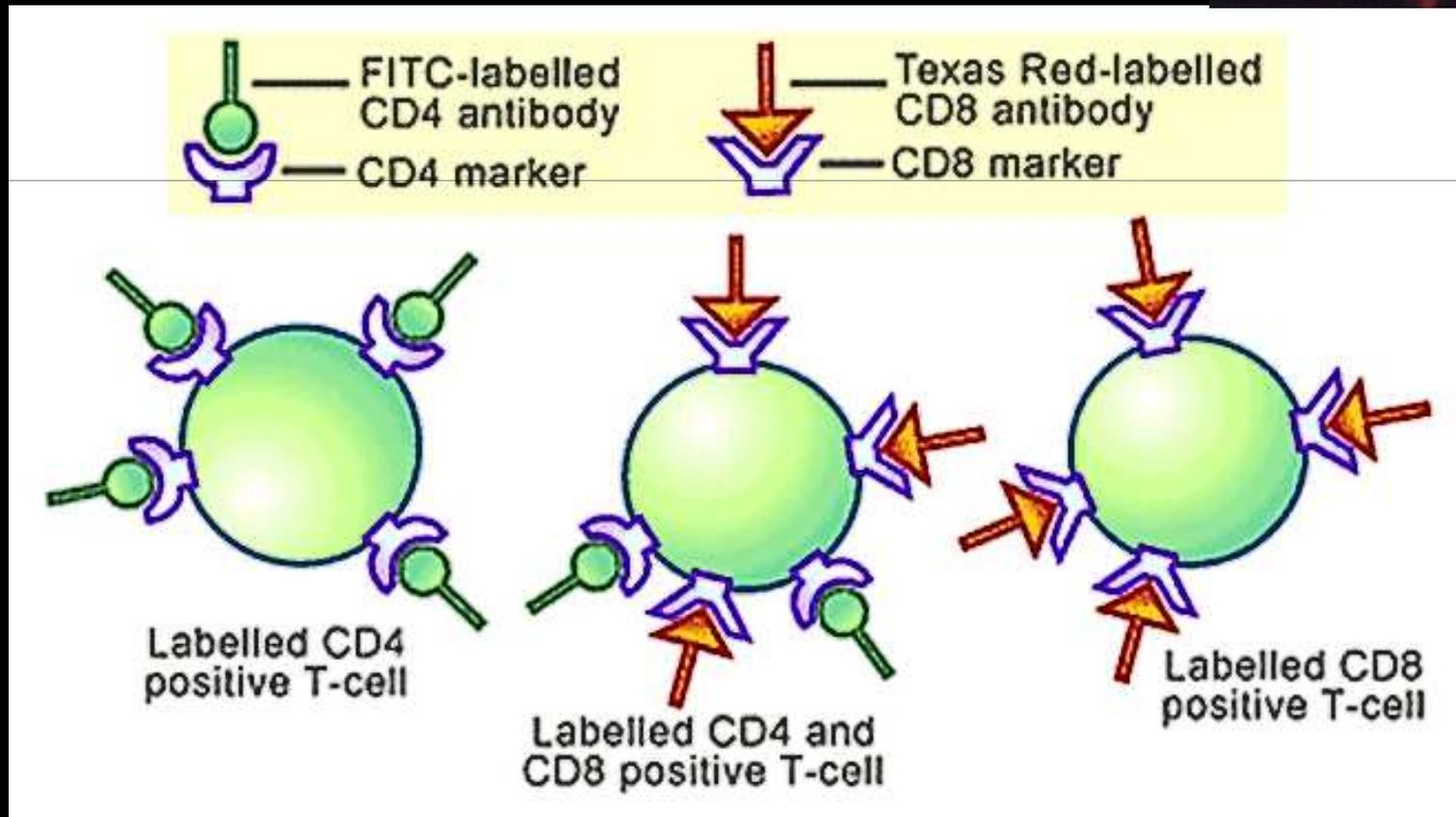
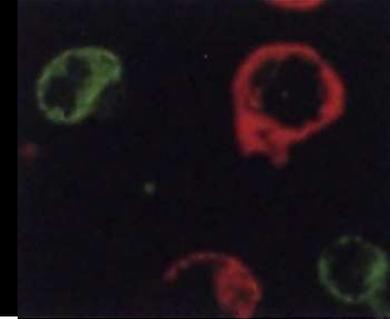
Com estimulação prévia



- Recurso a Ac Mc marcados com fluorocromos
- Método de **Citometria de Fluxo**

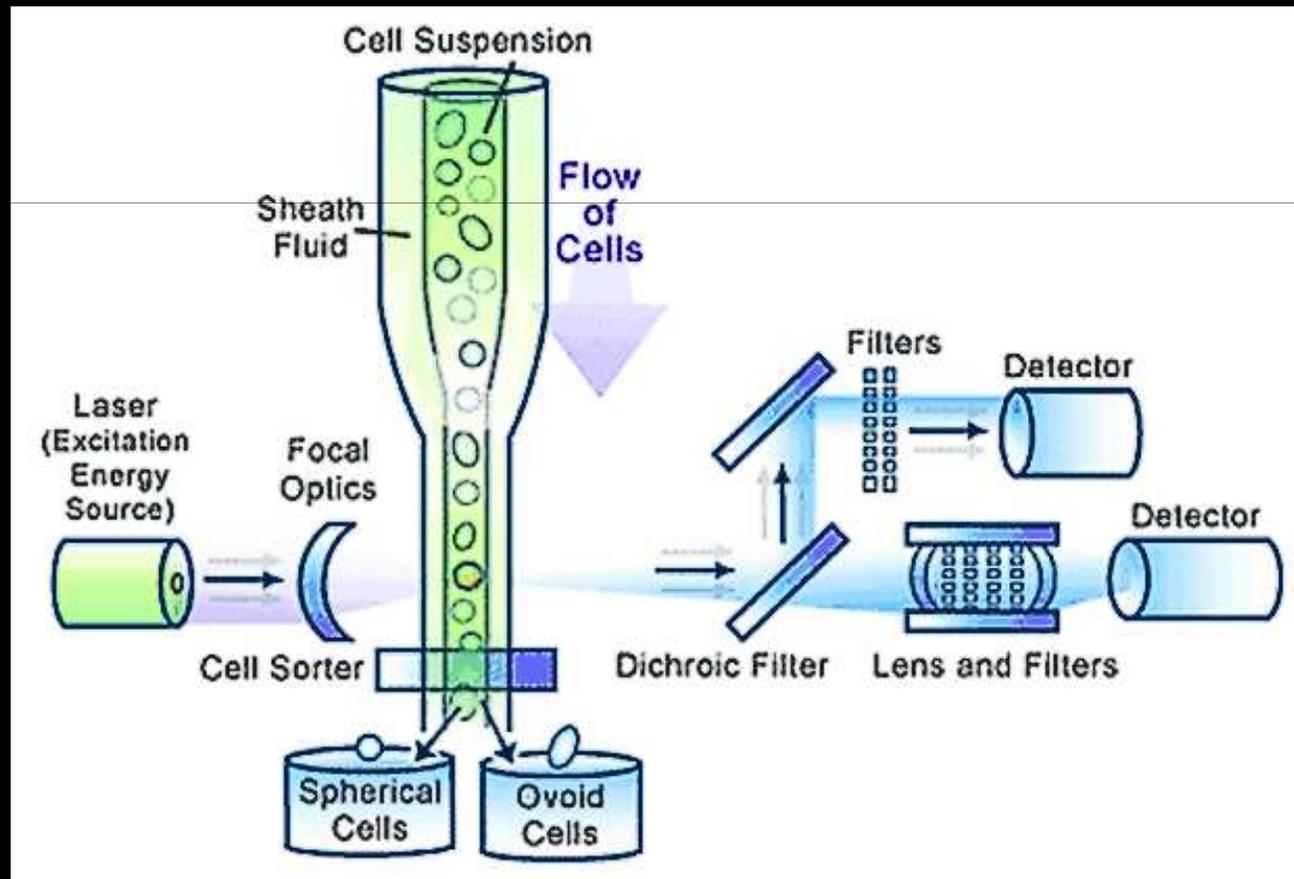
Imunofenotipagem

1º Marcação celular



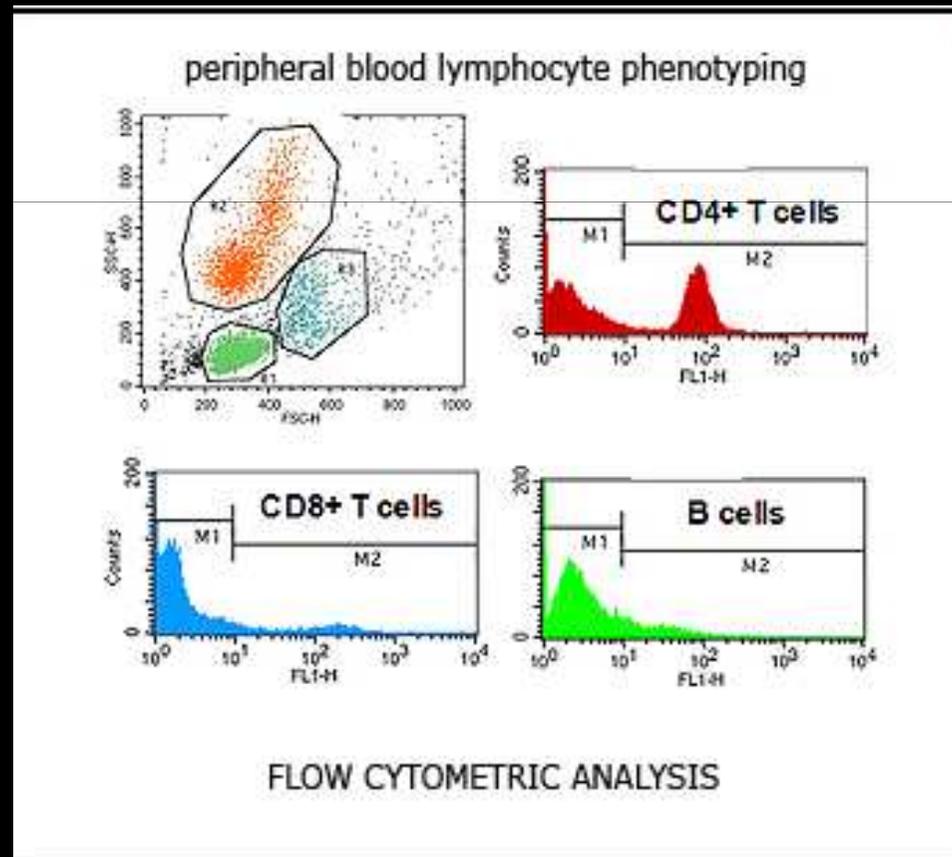
Imunofenotipagem

2º Detecção celular (Aquisição em Citómetro de Fluxo)



Imunofenotipagem

3º Análise computacional dos eventos (células) adquiridos

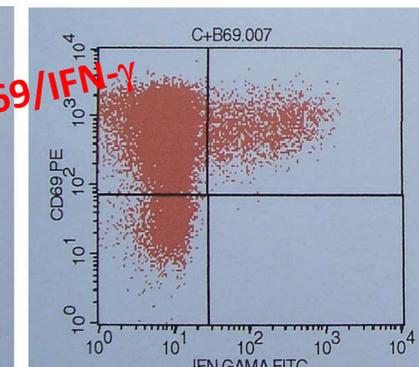
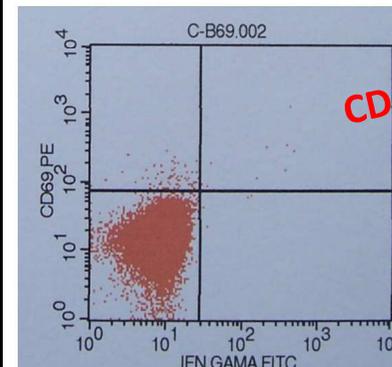
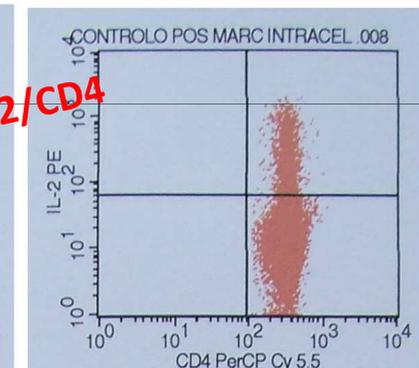
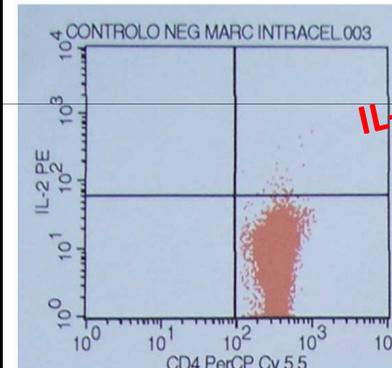
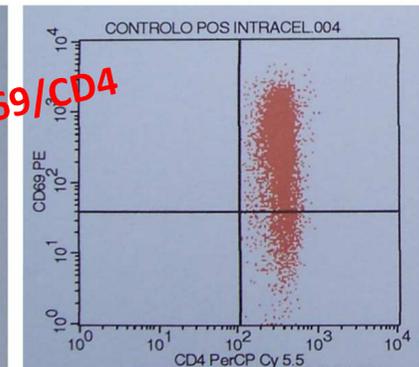
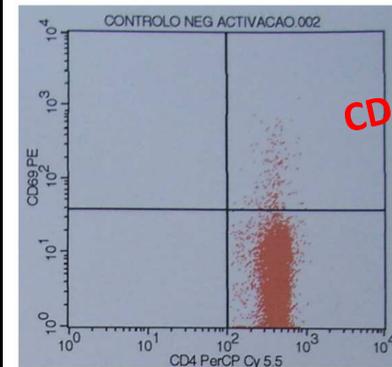


Imunofenotipagem

3º Análise computacional dos eventos (células) adquiridos

C. Neg.

C. Pos.

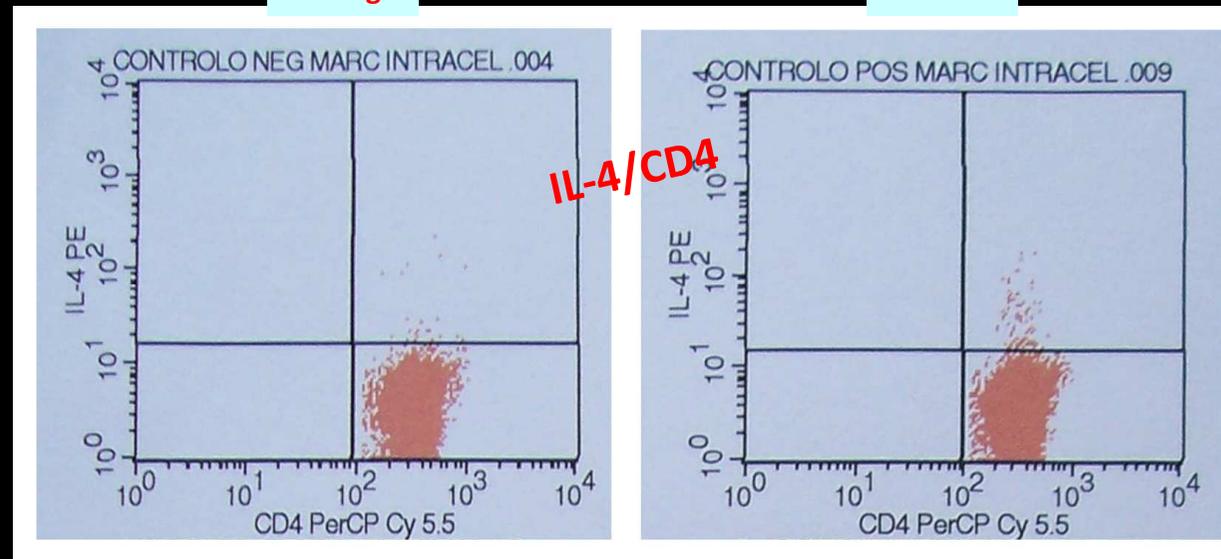


Imunofenotipagem

3º Análise computacional dos eventos (células) adquiridos

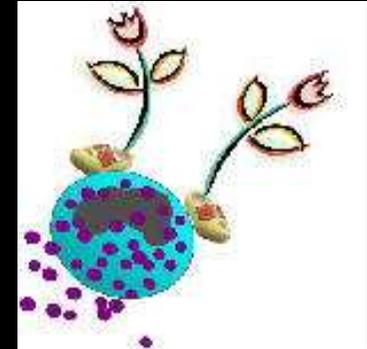
C. Neg.

C. Pos.



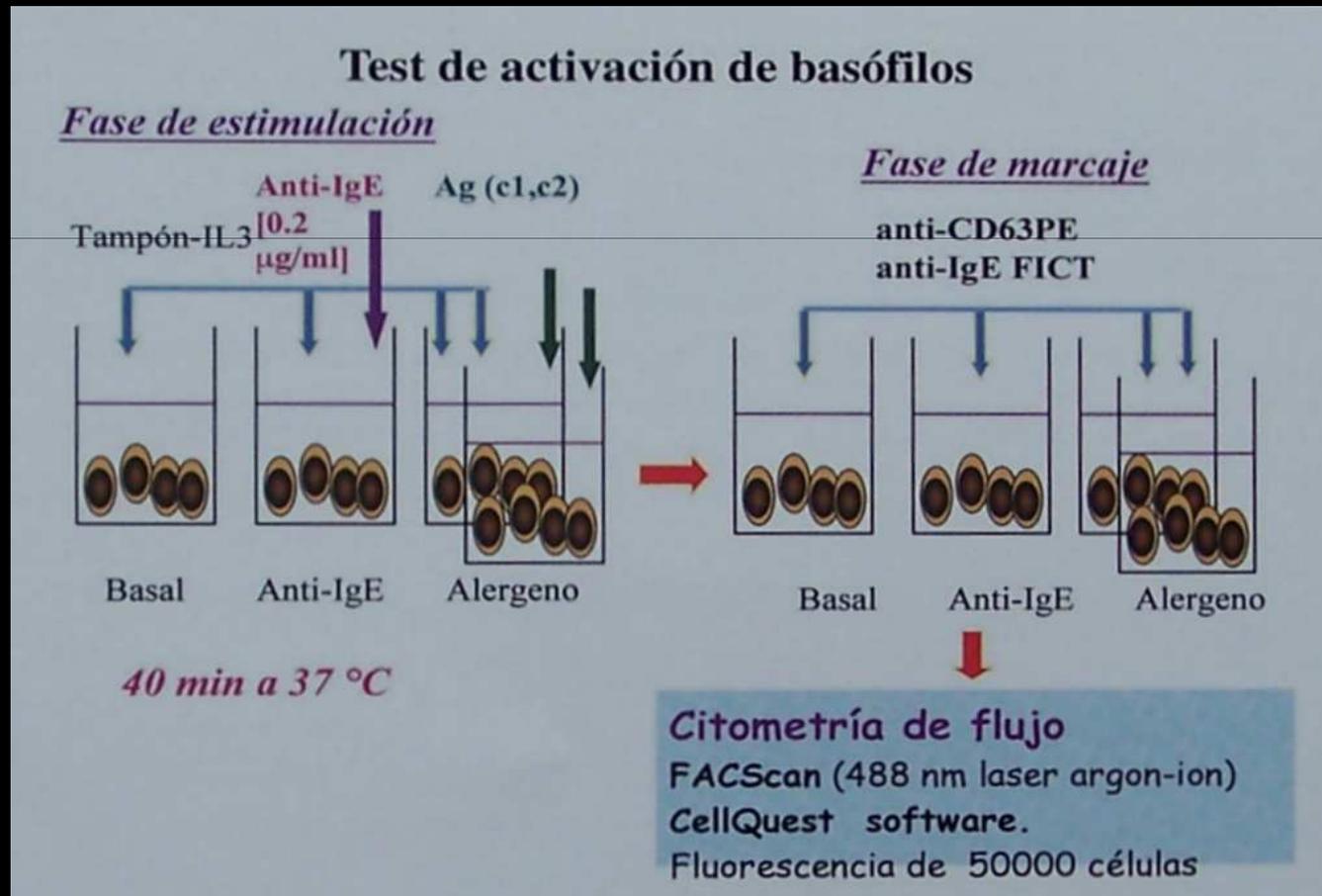
Teste de activação de basófilos

- Activação antigénio-específica *in vitro* de basófilos
- Aumento da expressão à superfície da célula, da proteína granular CD63
- Por Citometria de Fluxo → Marcação dos basófilos com:
 - Ac Mc anti-IgE – FITC (identifica os basófilos)
 - +
 - Ac Mc anti-CD63 – PE (marca os basófilos activados)



Teste de activação de basófilos

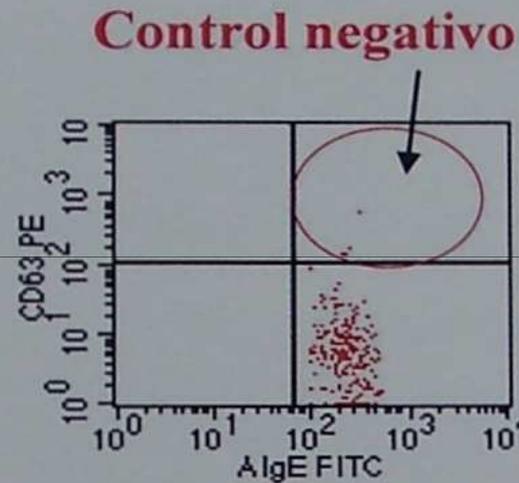
1º Activação em cultura... 2º Marcação celular... 3º Aquisição



Teste de activação de basófilos

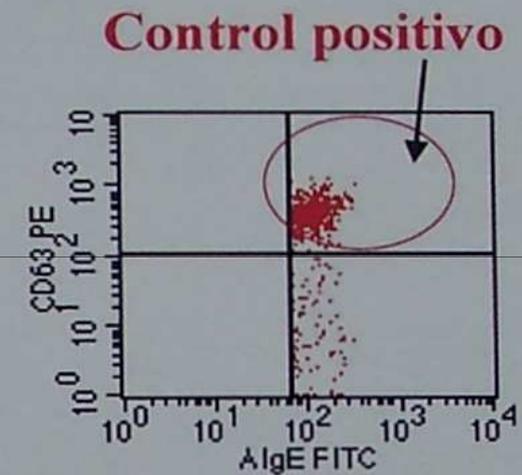
4º Análise computacional

Análisis células marcadas con CD63



Sample ID: CONTROL 1
Gated Events: 248
Total Events: 50000

Quad	Events	% Gated
UL	0	0.00
UR	4	1.61
LL	0	0.00
LR	244	98.39



Sample ID: ANTI IgE
Gated Events: 660
Total Events: 56975

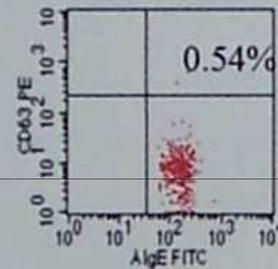
Quad	Events	% Gated
UL	6	0.91
UR	556	84.24
LL	4	0.61
LR	94	14.24

Teste de activação de basófilos

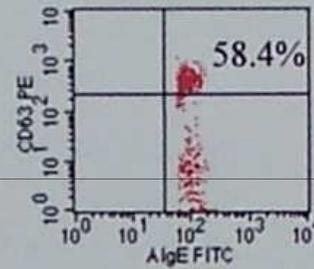
4º Análise computacional

Ejemplos TAB en sensibilización a ácaros

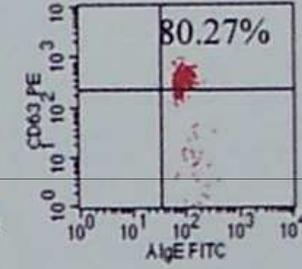
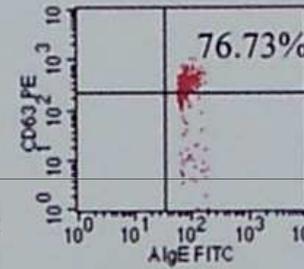
Control



Anti IgE

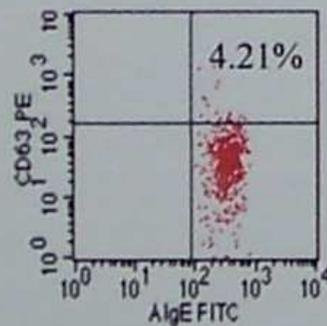


Derm pt

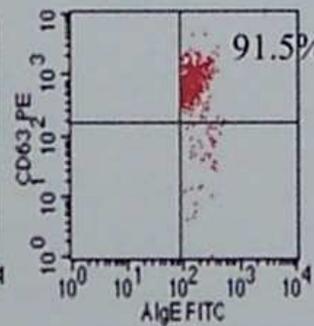


TAB en Sensibilización a gramíneas

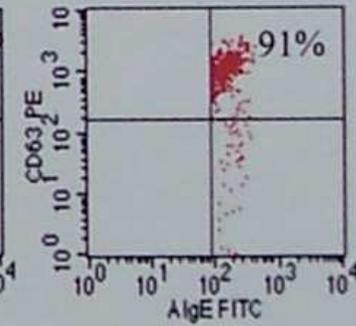
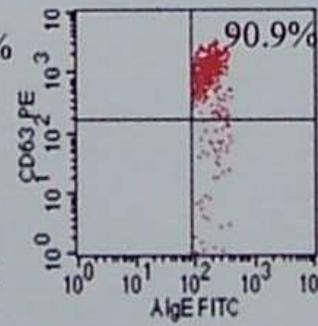
Control



Anti IgE

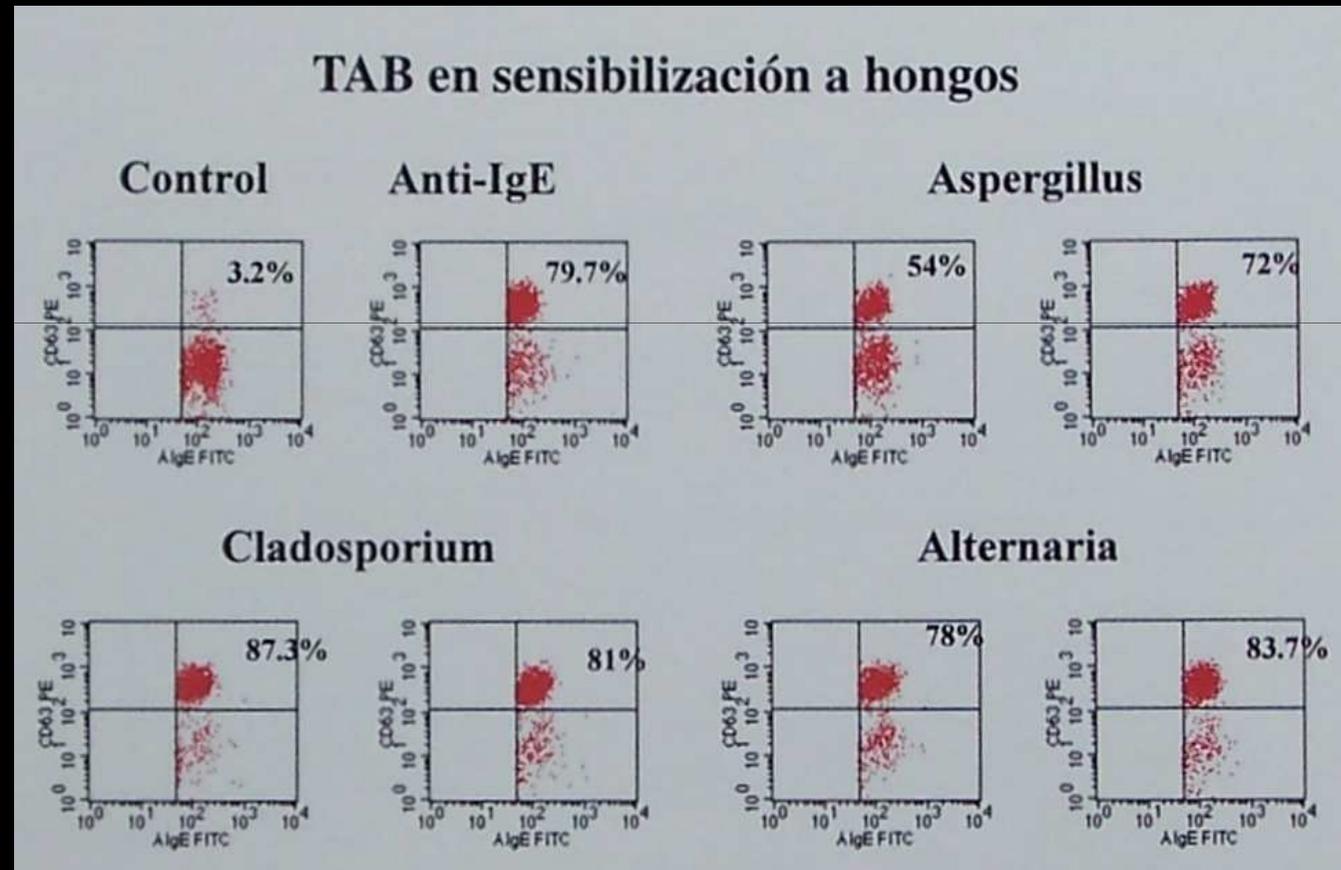


Lol p



Teste de activação de basófilos

4^o Análise
computacional

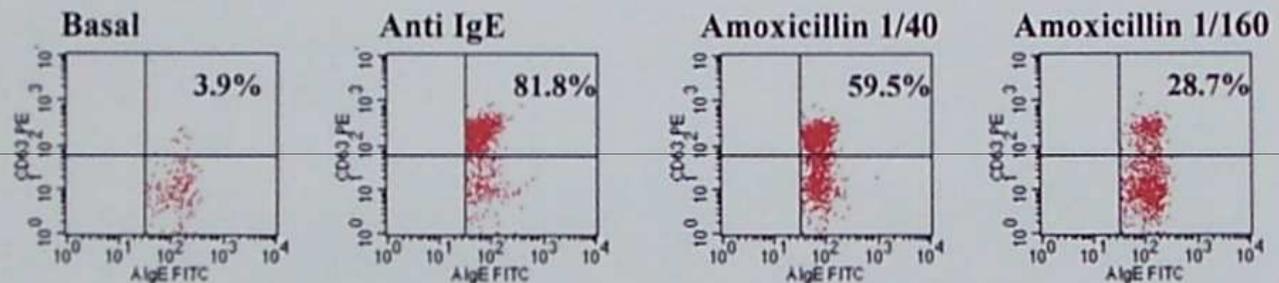


Teste de activação de basófilos

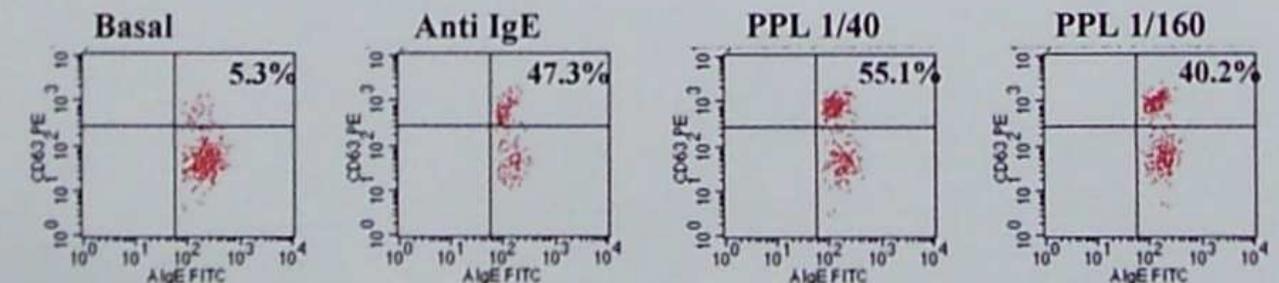
4º Análise
computacional

TAB en alergia a beta-lactámicos

Ejemplo nº1



Ejemplo nº2



Teste de activação de basófilos

Desempenho do método

	Inalantes	Alimentos	Beta-lactâmicos	Metabizol	Látex
Sensibilidade	93,30%	82,30%	50%	42,30%	93%
Especificidade	98%	63%	93,30%	100%	100%
<i>n</i>	105	54	58	26	43