



9º Simposio de Ensino de Graduação

IMUNORREATIVIDADE CELULAR À BETA-LACTOGLOBULINA NATIVA E POLIMERIZADA EM PACIENTES ALÉRGICOS

Autor(es)

GRAYCE KATLEN MORENO DA SILVA

Co-Autor(es)

REGIANE PATUSSI DOS SANTOS LIMA
RAQUEL ACÁCIA PEREIRA GONÇALVES DOS SANTOS
CELSO EDUARDO OLIVIER
DAIANA GUEDES PINTO

Orientador(es)

JADSON OLIVEIRA SILVA

1. Introdução

A alergia às proteínas do leite de vaca é uma condição de difícil identificação e tratamento (Fiocchi, Brozek et al. 2010; Fiocchi, Schunemann et al. 2010). Dentre as proteínas do leite de vaca, a beta-lactoglobulina (BLG; Bos d 5) é uma das mais alergênicas, como demonstrado pelos testes cutâneos e provas de enfrentamento in vivo (Goldman, Anderson et al. 1963; Goldman, Sellars et al. 1963). A imunorreatividade às proteínas do leite de vaca é um assunto muito estudado, mas pouco se sabe à respeito da imunorreatividade às proteínas modificadas industrialmente às quais a população se expõe inadvertidamente. Um dos processos industriais mais utilizados pela indústria alimentícia é a polimerização enzimática de proteínas (Lorenzen, Neve et al. 2002; Lehrer and Bannon 2005; Jaros, Partschefeld et al. 2006). Uma das técnicas mais efetivas empregadas pelos engenheiros alimentares é a polimerização protéica pela transglutaminase microbiana (Fort, Carretero et al. 2007). A transglutaminase catalisa reações de acil-transferência entre os grupos gama-carboxamida dos resíduos de glutamina e o grupo epsilon-amino dos resíduos de lisina, promovendo uma ligação inter ou intra-molecular (DeJong and Koppelman 2002). Estudo prévio em camundongos sugeriu que a polimerização poderia reduzir a alergenicidade da beta-lactoglobulina bovina (Villas-Boas, Vieira et al. 2010). O presente estudo foi orientado pelas recomendações das Organização das Nações Unidas e da Organização Mundial de Saúde para analisar a alergenicidade dos alimentos derivados da biotecnologia (FAO/WHO 2001). Para tanto utilizamos um teste de enfrentamento in vitro monitorado pelo teste de inibição da aderência do leucócito. O teste de inibição da aderência do leucócito é um procedimento artesanal descrito para detecção de antígenos tumorais envolvidos na imunidade mediada por células (Halliday e Miller 1972). Tem similaridade com o correlato teste de inibição da migração do leucócito (Bullen e Losowsky 1978). São testes descritos para a detecção de imunorreatividade celular a antígenos tumorais, com relatos esporádicos na literatura do seu uso para a demonstração de imunorreatividade a alérgenos exógenos como, por exemplo, a poeira doméstica, a candidina, o PPD (Kuratsuji 1981), a beta-lactoglobulina bovina (Ashkenazi et al, 1980) e o glúten (Ashkenazi et al, 1978). A não-aderência do leucócito ao vidro induzida pelo enfrentamento com antígenos específicos depende basicamente de mecanismos celulares nos quais estariam envolvidos diversos tipos de células. Quando ativadas pela presença do antígeno específico, os linfócitos liberariam um fator solúvel (hipotetizado como o Fator de Inibição da Aderência do Leucócito ou LAIF de “Leukocyte Adherence Inhibition Factor) que agiria sobre os leucócitos conferindo a propriedade de não-aderência ao vidro (Halliday, 1979). O envolvimento dos linfócitos T foi sugerido pela observação

de que a presença de anticorpos murinos anti- θ (anti-theta) cancela a inibição da aderência (Holt et al, 1975). Os anticorpos murinos anti- θ são dirigidos especificamente contra o antígeno CH3 associados ao linfócito T (Greaves e Raff, 1971). Como os linfócitos T não são capazes de ligar-se diretamente ao antígeno (sendo dependentes da apresentação antigênica dentro do contexto TCR-MHC II), fica evidente que outras células ou outros componentes estão envolvidos. Não se obteve ainda de maneira satisfatória todos os mecanismos celulares e as citocinas envolvidas neste processo, porém demonstrou-se que os leucotrienos, e em especial o LTC₄, são fatores importantes no processo modulados pela secreção de interferon.

2. Objetivos

Comparar a imunorreatividade à BLG nativa e polimerizada através de um teste de enfrentamento in vitro pareado, monitorado pelo teste de inibição da aderência do leucócito.

3. Desenvolvimento

Alérgenos para o enfrentamento in vitro

A Beta-lactoglobulina (>95% de purificação) foi providenciada pela Davisco Foods Inc. A Beta-lactoglobulina polimerizada pela transglutaminase microbiana foi fornecida pelo Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

Participantes

Participaram da pesquisa 49 pacientes (19 homens e 30 mulheres, idade média 28,7 anos, desvio padrão 20,6) com diagnóstico clínico de doença atópica, atendidos em um ambulatório de alergia e imunologia. Este estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas e registrado no sistema nacional de ética em pesquisa (SISNEP 409/2008). Consentimento por escrito foi obtido de todos os participantes em concordância à declaração de Helsinki.

Métodos

Coletou-se amostra de 8 mL de sangue em tubo de coleta heparinizado para o teste de inibição da aderência do leucócito. A amostra é sedimentada espontaneamente a 37°C por uma hora para obtenção do creme leucocitário com células viáveis. A seguir o creme leucocitário é homogeneizado no plasma e a amostra é dividida em três partes, sendo que uma serve como controle e as outras são enfrentadas separadamente com a beta-lactoglobulina nativa e a beta-lactoglobulina polimerizada por meia hora em agitação de 200 rpm a 37°C. Para se obter uma quantidade suficiente de leucócitos separa-se 1 mL de plasma em um tubo de Eppendorf para cada antígeno testado. Para cada tubo adiciona-se 100 μ L de solução de antígeno a 10.000 PNU/mL, que corresponde a 0,7 mg/ml da beta-lactoglobulina nativa e 0,9 mg/mL da beta-lactoglobulina polimerizada. Após enfrentamento com antígeno as amostras de plasma são colocadas em câmaras hemocitométricas não espelhadas (Neubauer) e deixadas por duas horas em câmara úmida a 37°C para permitir a aderência dos leucócitos ao vidro da lâmina. A seguir os leucócitos são contados, lava-se a câmara hemocitométrica gentilmente com movimento vertical único em um frasco de Becker com PBS a 37°C. A seguir coloca-se outra lamínula e completa-se a câmara com PBS a 37°C e contam-se novamente os leucócitos restantes (aderidos). Realiza-se o mesmo procedimento no plasma controle e observa-se a diferença na aderência entre as duas leituras. Após as contagens nas câmaras realiza-se então o cálculo da taxa de aderência da amostra controle e das amostras enfrentadas, que corresponde à contagem pós-lavagem dividida pela contagem pré-lavagem multiplicada por 100. A taxa de inibição da aderência (TIA) é calculada segundo a fórmula $TIA = [1 - (\% \text{ células aderentes da amostra enfrentada} / \% \text{ células aderentes da amostra controle})] \times 100$ (Holt et al, 1975).

4. Resultado e Discussão

Os resultados estão apresentados na tabela 1. Entre os 49 testes pareados houve uma correlação significativa entre a taxa de inibição da aderência dos testes enfrentados com a beta-lactoglobulina nativa quando comparada com as taxas de inibição da aderência dos testes enfrentados com a beta-lactoglobulina polimerizada (coeficiente de correlação $r = 0,65$ e $P < 0,0001$) A inibição de aderência média dos enfrentamentos realizados com a beta-lactoglobulina nativa foi de 39,6% e a inibição de aderência média dos enfrentamentos realizados com a beta-lactoglobulina polimerizada foi de 47,6%. A diferença de 8,0 não foi considerada significante pelo teste t pareado ($P = 0,07$).

A polimerização de proteínas alergênicas é uma técnica utilizada para diminuir a alergenicidade de alimentos e na preparação de alérgenos modificados (alergóides) para a imunoterapia dessensibilizante (Marsh, Lichtenstein et al. 1970; HayGlass and Strejan 1983; Watanabe, Suzuki et al. 1994; Wróblewska, J?drychowski et al. 2008). Dentre as proteínas do soro do leite de vaca, a beta-lactoglobulina é uma das mais importantes devido à sua concentração (3g/L) e alta alergenicidade devido à sua baixa digestibilidade. As glândulas mamárias humanas não produzem beta-lactoglobulina, que também não é secretado no leite humano,

mesmo se a lactante ingerir o leite de vaca. Produtos industrializados também são uma fonte de proteínas modificadas. A transglutaminase bacteriana é uma enzima comumente utilizada para polimerizar proteínas. É utilizada na produção de queijo de coalho (Cozzolino, Di Pierro et al. 2003) e como uma ferramenta para diminuir a sinérise do soro, aumentando a consistência e viscosidade do iogurt (Lorenzen, Neve et al. 2002). Estudos em animais sugeriram a possibilidade de que a polimerização seja capaz de diminuir a imunogenicidade da beta-lactoglobulina (Villas-Boas, Vieira et al. 2010). No modelo de estudo adotado no presente trabalho, apesar de existir uma pequena diminuição na imunorreatividade aferida pelo teste de inibição da aderência do leucócito, esta diferença não foi significativa.

5. Considerações Finais

O modelo de aferição da imunorreatividade à beta-lactoglobulina nativa e polimerizada através da prova de enfrentamento in vitro monitorada pelo teste de inibição da aderência do leucócito mostrou-se consistente quando se analisou a correlação entre os testes pareados. Não houve, no entanto diferença significativa de imunorreatividade entre as formas nativa e polimerizada da beta-lactoglobulina.

Referências Bibliográficas

- ASHKENAZI, A. et al. "In Vitro Cell-Mediated Immunologic Assay for Cow's Milk Allergy." *Pediatrics* 66(3): 399-402, 1980.
- BULLEN, A. W. e LOSOWSKY M. S. "Comparison of a leucocyte adherence test with the leucocyte migration inhibition test and skin reactivity to PPD." *Clin Exp Immunol* 31(3): 408-13, 1978.
- COZZOLINO, A., P. Di PIERRO, et al. (2003). "Incorporation of whey proteins into cheese curd by using transglutaminase." *Biotechnol Appl Biochem* 38(Pt 3): 289-95.
- DE JONG, G. A. H. e S. J. KOPPELMAN (2002). "Transglutaminase Catalyzed Reactions: Impact on Food Applications." *Journal of Food Science* 67(8): 2798-2806.
- FAO/WHO (2001). Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO) available at <http://www.fao.org/ag/agn/food/pdf/allergygm.pdf>: 27.
- FIOCCHI, A., J. BROZEK, et al. (2010) "World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines." *Pediatric Allergy Immunol* 21 Suppl 21: 1-125.
- FIOCCHI, A., H. J. SCHUNEMANN, et al. (2010) "Diagnosis and Rationale for Action Against Cow's Milk Allergy (DRACMA): a summary report." *J Allergy Clin Immunol* 126(6): 1119-28 e12.
- FORT, N., C. CARRETERO, et al. (2007). "Combined treatment of porcine plasma with microbial transglutaminase and cysteine: Effects on the heat-induced gel properties." *Food Hydrocolloids* 21(3): 463-471.
- GOLDMAN AS, ANDERSON JR DW, et al. (1963). "Milk Allergy. I. Oral Challenge with Milk and Isolated Milk Proteins in Allergic Children." *Pediatrics* 32: 425-43.
- GOLDMAN AS, SELLARS WA, et al. (1963). "Milk Allergy. II. Skin Testing of Allergic and Normal Children with Purified Milk Proteins." *Pediatrics* 32: 572-9.
- GREAVES, M. F. e RAFF M. C. "Specificity of anti-theta sera in cytotoxicity and functional tests on T lymphocytes." *Nat New Biol* 233(42): 239-41, 1971.
- HALLIDAY, W. J. e MILLER S. "Leukocyte adherence inhibition: a simple test for cell-mediated tumour immunity and serum blocking factors." *Int J Cancer* 9(3): 477-83, 1972.
- HOLT, P. G. et al. "The L.A.I. microtest: a rapid and sensitive procedure for the demonstration of cell-mediated immunity in vitro." *J Immunol Methods* 8(3): 277-88, 1975.

JAROS, D., C. PARTSCHEFELD, et al. (2006). "Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications." *Journal of Texture Studies* 37(2): 113-155.

LEHRER, S. B. and G. A. Bannon (2005). "Risks of allergic reactions to biotech proteins in foods: perception and reality." *Allergy* 60(5): 559-64.

KURATSUJI T. (1981) Studies on leukocyte adherence inhibition test. Part II. Clinical applications of LAI test to detect delayed type hypersensitivity in infants and children. *Keio J Med* 30(2):65-9.

LORENZEN, P. C., H. NEVE, et al. (2002). "Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt." *Int J Dairy Technol* 55(3): 152-157.

MARSH, D. G., L. M. LICHTENSTEIN, et al. (1970). "Studies on "allergoids" prepared from naturally occurring allergens. I. Assay of allergenicity and antigenicity of formalinized rye group I component." *Immunology* 18(5): 705-22.

VILLAS-BOAS, M. B., K. P. VIEIRA, et al. (2010). "The effect of transglutaminase-induced polymerization in the presence of cysteine on [beta]-lactoglobulin antigenicity." *International Dairy Journal* 20(6): 386-392.

WATANABE, M., T. SUZUKI, et al. (1994). "Controlled Enzymatic Treatment of Wheat Proteins for Production of Hypoallergenic Flour." *Biosci Biotechnol Biochem* 58(2): 388-390.

WRÓBLEWSKA B, JEDRYCHOWSKI L, et al. (2008). "Influence of Alcalase and transglutaminase on immunoreactivity of cow milk whey proteins." *Czech J. Food Sci.* 26: 15-23.

Anexos

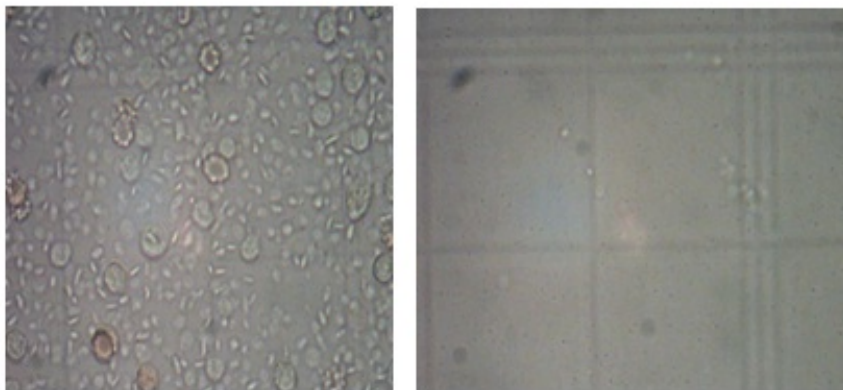


Foto da lâmina incubada com antígeno (beta-lactoglobulina nativa antes e depois da lavagem em PBS.

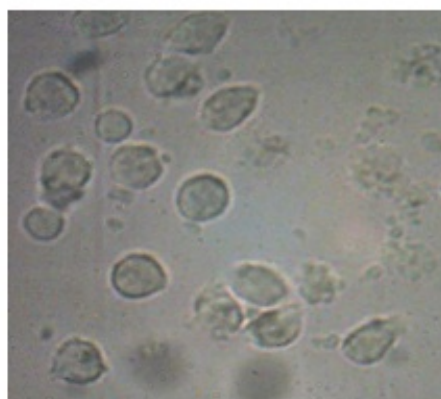
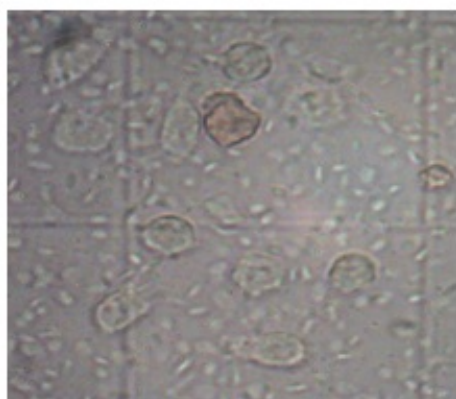


Foto do controle Positivo mostrando a aderência dos leucócitos antes (A) depois de lavagem com PBS (B)

Iniciais	Idade (anos)	Taxa de Aderência Controle	Taxa de Aderência BLG nativa	Taxa de Inibição BLG nativa	Taxa de Aderência BLG-Pol	Taxa de Inibição BLG-Pol
ACA	21	100	91	9	78	22
AMCM	41	100	36	64	0	100
ACM	18	100	100	0	100	0
APS	13	100	19	81	13	87
ACR	12	100	43	57	0	100
ABP	3	100	38	62	36	64
BSF	6	100	100	0	51	49
CMG	43	100	94	6	92	8
CJ	55	100	90	10	52	48
DHS	7	100	100	0	100	0
DMS	43	100	40	60	19	81
DCBG	40	100	90	10	50	50
EB	33	100	84	16	11	89
EMR	1	100	43	57	37	63
FRLS	33	100	34	66	51	49
GSP	3	100	100	0	84	16
GHF	31	100	35	65	57	43
HML	9	100	13	87	10	90
HN	7	100	100	0	100	0
IAG	66	100	0	100	30	70
IFS	25	100	70	30	50	50
JLS	55	100	100	0	72	28
JCFL	23	100	36	54	0	100
JLM	30	100	100	0	100	0
JFP	64	100	100	0	73	27
KA	29	100	100	0	100	0
KTP	8	100	52	48	44	56
LFO	22	100	100	0	45	55
LF	2	100	56	44	50	50
LWC	7	100	64	36	71	29
LBGS	10	100	17	83	100	0
LAT	50	100	31	69	0	100
MJFC	49	100	100	0	100	0
MCD	50	100	100	0	100	0
MCM	23	100	0	100	0	100
MLF	58	100	100	0	100	0
MAG	33	100	56	44	10	90
MHR	4	100	100	0	35	65
NYM	26	100	0	100	0	100
NS	41	100	17	83	100	0
JLG	8	100	100	0	100	0