

## **AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOQUÍMICO DA GLOBULINA PRINCIPAL DE TREMOÇO-DOCE, GRÃO-DE-BICO, LENTILHA E SOJA APÓS TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS.**

Sílvia E. S. C. Pinto, Beatriz M. M. Medeiros, Valéria A. A. Mallavolta, Maraiza A. Silva, Valdir A. Neves.–  
Imunologia – Farmácia e Bioquímica – Departamento de Ciências Biológicas e Departamento de Alimentos e Nutrição- Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara

Este projeto dá continuidade a um estudo sobre a caracterização imunológica da globulina principal de tremoço-doce, grão-de-bico, lentilha e soja, em andamento em nosso laboratório (OLIVEIRA et al., 2004). O projeto conta com o apoio do laboratório de Bioquímica de Alimentos, que realiza o isolamento da globulina principal destas leguminosas. A partir do isolamento, foram feitos os ensaios imunológicos para análise das globulinas das leguminosas mencionadas.

Os efeitos de tratamentos enzimáticos sobre a antigenicidade das globulinas estudadas foram analisados através do teste ELISA. Para averiguar uma possível reatividade cruzada entre essas proteínas, foi utilizado um soro de coelho anti-globulina principal de tremoço-doce, obtido em nosso laboratório.

Modificações enzimáticas são ferramentas úteis no estudo das relações entre estrutura e função das proteínas. Vários pesquisadores avaliaram a imunogenicidade e/ou alergenicidade de proteínas hidrolisadas enzimaticamente para uso potencial em fórmulas para alimentar indivíduos alérgicos a alimentos (CORDLE, 1994; PEÑAS et al., 2006), isso porque, a resistência das proteínas das leguminosas às enzimas digestivas está intimamente associada com o aumento do risco de reações de hipersensibilidade sistêmicas e sensibilização oral (ASTWOOD et al., 1996; YAGAMI et al., 2000).

Anticorpos monoclonais podem ser usados para detectar mudanças estruturais ocorridas na molécula de proteína após os diferentes processos aos quais esta é submetida. Quando uma proteína nativa é submetida a algum tratamento físico-químico ou enzimático, pode-se criar em sua estrutura novos epítomos que não reagem com os mesmos anticorpos que se ligam à molécula nativa. Entretanto, alguns epítomos que estão ocultos no interior da molécula nativa, se tornam suscetíveis aos anticorpos apenas quando a estrutura da molécula nativa é modificada (MAHANA et al, 1991).

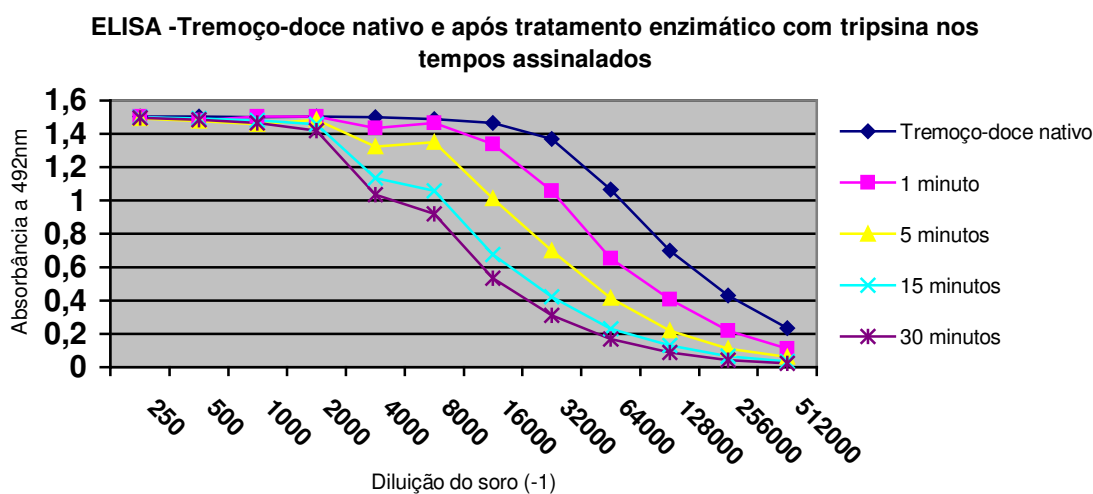
Embora não possamos prever a alergenicidade de uma dada proteína, o entendimento dos atributos estruturais de proteínas que as predisponham a se tornarem alergênicas é muito importante.

A identificação de epítomos comuns a elas poderá ser útil em futuros estudos sobre alergenicidade e digestibilidade destas globulinas.

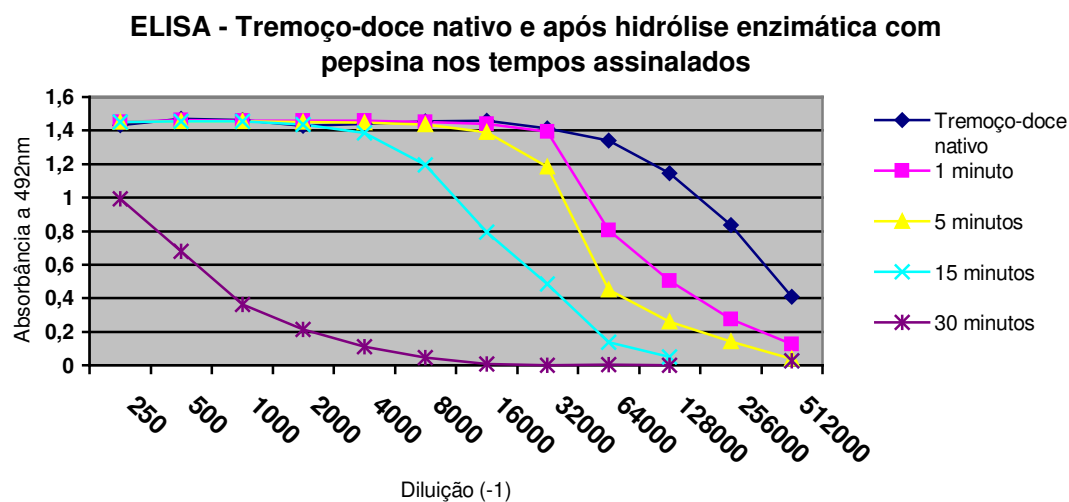
Para a realização do ensaio imunoenzimático, técnica indireta (MEDEIROS et al., 1991), microplacas com 96 cavidades, fundo em U, foram sensibilizadas com 100µL das globulinas nativas ou tratadas, em concentrações padronizadas de 1,25µg/mL e incubadas a 4°C durante 18 horas. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T). O soro de coelho anti-globulina principal de tremoço-doce foi diluído em PBS/T contendo 1% de soro albumina bovina (PBS/T/BSA) e adicionado às cavidades das placas (100µL), em diluições sucessivas (fator 2), a partir de 1/250 até 1/512000, seguido de incubação a 37°C durante 1 hora. As placas foram lavadas novamente com PBS/T e foram adicionados 100µL de um conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (PIERCE®), diluído em PBS/T/BSA, em diluição padronizada 1/2000, e incubadas a 37°C durante 1 hora. Terminada a incubação foi feita nova lavagem das placas com PBS/T. Foram realizados os controles do antígeno e conjugado e, simultaneamente, foi ensaiado um soro normal de coelho como controle negativo. Para o desenvolvimento da reação imunoenzimática foi adicionado 100µL de solução de substrato (1mg/mL de orto-fenilenodiamina em tampão citrato 0,1M, pH 5,0, contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio) seguido de incubação das placas durante 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi bloqueada com 100µL de HCl 3N. A leitura das placas foi feita por meio de medidas de absorbância a 492nm (“Microplate reader”, modelo 550, BIORAD®).

Os resultados obtidos mostraram que o soro anti-globulina principal de tremço-doce também reage com as globulinas de grão-de-bico, lentilha e soja na forma nativa e submetidas a tratamentos enzimáticos. A reação homóloga ocorreu até a diluição 1/32000 do soro. O tratamento da lentilha com tripsina anulou a antigenicidade desta globulina, enquanto que o tratamento com pepsina expôs novos epítomos. Na diluição 1/4000 do soro, a reatividade da lentilha nativa frente ao soro anti-globulina de tremço-doce é de 50%, e nessa mesma diluição há 100% de reatividade da globulina tratada com pepsina nos tempos 1 a 30 min.

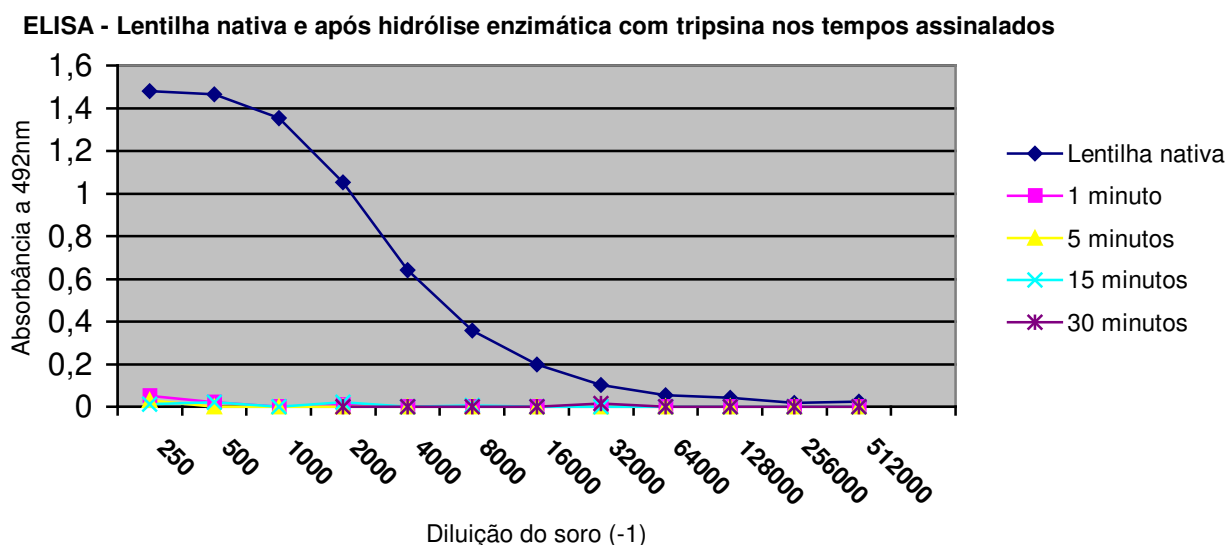
No tratamento com tripsina, na diluição 1/1000 do soro, em todos os tempos, nota-se aproximadamente 50% de reatividade, comparando-se com a globulina de grão-de-bico nativa (que é de 98%). Entretanto, o tratamento com pepsina parece exercer ação gradual na queda da reatividade dessa globulina, pois na diluição 1/1000 do soro, em 1 minuto de tratamento a reatividade é de 93%, seguida de 77% no tempo 5 min, e aproximadamente 20% nos tempos 15 e 30min. A antigenicidade da soja não é alterada pela tripsina. No tratamento com pepsina, a partir de 5 min, na diluição 1/4000 do soro, a reatividade é de aproximadamente 50%, (sendo que a soja nativa apresenta 93% de reatividade), e chega, no tempo 30 min, a 37%.



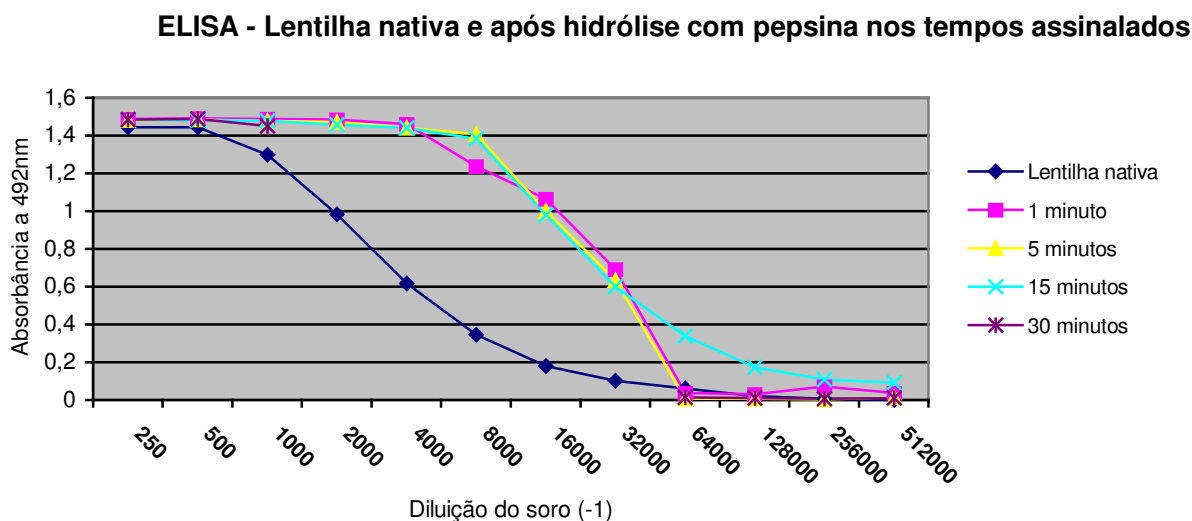
**Figura 1** – Reatividade do soro de coelho anti-globulina de tremço-doce com as globulinas de tremço-doce nativo e tratado com tripsina nos tempos assinalados. A placa foi sensibilizada com 1,25µg/mL das globulinas. O soro de coelho anti-globulina de tremço-doce foi adicionado em diluições seriadas à partir de 1/250. O conjugado anti-IgG de coelho foi diluído a 1/2000.



**Figura 2** – Reatividade do soro de coelho anti-globulina de tremço-doce com as globulinas de tremço-doce nativo e tratado com tripsina nos tempos assinalados. A placa foi sensibilizada com 1,25µg/mL das globulinas. O soro de coelho anti-globulina de tremço-doce foi adicionado em diluições seriadas à partir de 1/250. O conjugado anti-IgG de coelho foi diluído a 1/2000.



**Figura 3** – Reatividade do soro de coelho anti-globulina de tremço-doce com as globulinas de lentilha nativa e tratada com tripsina nos tempos assinalados. A placa foi sensibilizada com 1,25µg/mL das globulinas. O soro de coelho anti-globulina de tremço-doce foi adicionado em diluições seriadas à partir de 1/250. O conjugado anti-IgG de coelho foi diluído a 1/2000.



**Figura 4** – Reatividade do soro de coelho anti-globulina de tremço-doce com as globulinas de lentilha nativa e tratada com pepsina nos tempos assinalados. A placa foi sensibilizada com 1,25µg/mL das globulinas. O soro de coelho anti-globulina de tremço-doce foi adicionado em diluições seriadas à partir de 1/250. O conjugado anti-IgG de coelho foi diluído a 1/2000.

Concluimos que as globulinas de leguminosas, quando tratadas com pepsina e tripsina, são lisadas em fragmentos polipeptídicos menores e isso, na maioria dos casos, diminui a reatividade dessas proteínas.

## **Referências Bibliográficas:**

OLIVEIRA, M., MEDEIROS, B.M.M. , MALLAVOLTA, V.A.A., NEVES, V.A., SILVA, M.A. Caracterização imunológica da globulina principal de tremçoço-doce (*Lupinus albus* L.), grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) e lentilha (*Lens esculenta*). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 15, 2003, Marília. *Resumos...*Marília: Universidade Estadual Paulista, 2004, CD-Rom.

CORDLE, C. T. Control of food allergies using protein hidrolysates. **Food Technol.**, v.48, p.72-76, 1994.

PEÑAS, E., PRÉSTAMO, G., POLO, F. & GOMEZ, R. Enzymatic proteolysis, under high pressure of soybean whey: Analysis of peptides and the allergen Gly m 1 in the hidrolysates **Food Chemistry** v.99(3) p.569-73, 2006.

ASTWOOD, J.D., LEACH, J. N. & FUCHS, R. L. Stability of food allergens to digestion in vitro. **Nat. Biotechnol.** 14:1269-73, 1996.

YAGAMI, T., HAISHIMA Y. NAKAMURA, A. OSUNA, H. & IKEZAWA, Z. Digestibility of allergens extracted from natural rubber latex and vegetable foods. **J. Allergy Clin. Immunol.** v.106 p.752-62, 2000.

MAHANA, W., NANDI, P. K., PARAF, A. Antigenic properties of ovoalbumin following heat denaturation as revealed by monoclonal antibodies: epitopic charges during heat treatment, **J. Food Science.** v.56, p.224, 1991.

MEDEIROS, B. M. M., MENDES-GIANNINI, M. J. S. & FALCÃO, D. P. Immunoglobulin produced by mice experimentally infected with *Yersinia sp.* **Contrib. Microiol. Immunol.**, v.12, p.117-22, 1991.

**Bolsa: FAPESP**