



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

EFEITO DA ENZIMA TRANSGLUTAMINASE NA ANTIGENICIDADE DA β -LACTOGLOBULINA

Autora: MARIANA BATTAGLIN VILLAS BÔAS
Orientadora: Profa Dra. FLAVIA MARIA NETTO

Campinas, 2008



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

EFEITO DA ENZIMA TRANSGLUTAMINASE NA ANTIGENICIDADE DA β -LACTOGLOBULINA

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Autora: MARIANA BATTAGLIN VILLAS BÔAS
Orientadora: Profa Dra. FLAVIA MARIA NETTO

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

V713e Villas Bôas, Mariana Battaglin
Efeito da enzima transglutaminase na antigenicidade da β –
Lactoglobulina / Mariana Battaglin Villas Boas. -- Campinas, SP:
[s.n.], 2008.

Orientador: Flavia Maria Netto
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Ligações cruzadas. 2. Polímeros. 3. Soro de leite. 4.
Alergenicidade. I. Netto, Flavia Maria. II. Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Effect of the transglutaminase enzyme in the antigenicity of the β -lactoglobulin

Palavras-chave em inglês (Keywords): Cross linking, Polymers, Whey protein, Allergenicity

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Flavia Maria Netto

Ricardo de Lima Zollner

Rosemary Aparecida de Carvalho

Lucia de la Hoz Urrejola

Data da defesa: 28/02/2008

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Flavia Maria Netto
(Orientadora)

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
(Membro)

Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho
(Membro)

Profa. Dra. Lucia de la Hoz Urrejola
(Membro)

Campinas, de de 2008.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Gelson e Araci e, ao Alexandre, pelo amor, preocupação e constante apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por me guiar e permitir que eu esteja aqui neste momento.

À Profa. Dra. Flávia Maria Netto, pela orientação, confiança, ensinamentos e amadurecimento profissional adquirido.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, pela colaboração, credibilidade e ensinamentos.

A minha querida família, meu alicerce, com quem encontro meus momentos de paz. Agradeço todos os dias por tê-los em minha vida.

Aos meus amados pais, fundamentais na minha vida, Gelson e Araci, obrigada por tudo, principalmente pela vida que me proporcionaram, pela educação, amor e apoio sempre constantes, sem vocês eu não teria chegado até aqui, nada disso seria possível. Aos meus queridos irmãos, Fabrício e Lucas, pelo carinho e amor sempre presentes. Meus sobrinhos lindos: Hellena Maria, Isabella Maria e Pedro Miguel, com vocês ao meu lado é bom demais ser titia, vocês são o sinônimo da felicidade na minha vida. A minha cunhada e amiga Viviane, que sempre se preocupou comigo e com minha felicidade. À tia Clélia, minha “tia-mãe” pelas palavras e amor. A vocês meus queridos, muito obrigada por tudo! Amo vocês!

A minha segunda família, Maria, Valdir, Denise, Fábio, Eduardo e Murilo, vocês são muito importantes na minha vida, obrigada pela consideração, carinho e constante apoio.

Às amigas do LBN e companheiras de trabalho: Eliana, Bete, Liz, Michele e Andréa pela amizade, ajuda e por tornar meus dias mais alegres.

Às amigas do LBN Eliriane (Li), Carol (Pazi) e Cinthia (LFP), que além de amigas de trabalho, tornaram-se amigas pra qualquer hora, com vocês a caminhada se tornou mais fácil, a carga ficou bem mais leve. Obrigada pelo apoio. Nossa amizade ficará pra sempre! Já sinto a falta de vocês, pessoas “excelentes”, irmãs que ganhei!

À Lucia, pela amizade, atenção e conversas que tanto contribuíram para execução deste trabalho.

Ao Chico (técnico e grande amigo), pela amizade, ajuda, paciência e cafezinhos que nos distraia e deixava os dias mais alegres. Conhecê-lo foi um presente. À Suzana e Fátima, pelo apoio, amizade e alegria.

Aos meus amigos de sempre: Carol, Bia, Dani, Marielle, Jú, Jeniffer, Carol (Amora), Marina (Fundi), Sylvania (Indaiá) e, aos mais recentes, porém não menos importantes, que encontrei em Campinas: Aline, Rafael, Jane, Andréa (DEPAN), e também Júlia, Cinthia, Taísa, Rô e Maurício, pelo apoio e momentos compartilhados.

As amigas do LIAE, Conceição, Meg, Karla, Giovanna, Priscila e Fernanda, obrigada por tudo, foram fundamentais não só no desenvolvimento do meu trabalho, mas no meu dia-a-dia, adorei conhecer vocês.

À banca examinadora pela disponibilidade e colaboração para finalização deste trabalho.

A todos os professores, amigos e funcionários da FEA e DEPAN que conheci e que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

À AJINOMOTO, pela gentileza no fornecimento da enzima transglutaminase, para desenvolvimento do trabalho.

À DAVISCO, pela atenção e gentileza no fornecimento da proteína β -Lactoglobulina, para desenvolvimento do trabalho.

À FAEPEX, pela concessão de auxílio pesquisa para desenvolvimento deste projeto.

Ao professor (quase doutor!), revisor, amigo e namorado Alexandre. Você foi e continuará sendo minha fonte de inspiração. Estamos juntos! Sempre! Amo-te muito, obrigada pela força, incentivo e constante ajuda. Obrigada por ser assim... Teu sucesso é o meu sucesso. Nova etapa, amor de sempre.

*“- Adeus, disse a raposa. Eis o meu segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração.
O essencial é invisível para os olhos.*

- O essencial é invisível para os olhos, repetiu o príncipezinho, a fim de se lembrar.

- Foi o tempo que perdeste com tua rosa que fez tua rosa tão importante.

- Foi o tempo que eu perdi com a minha rosa..... repetiu o príncipezinho, a fim de se lembrar.

*- Os homens esqueceram essa verdade, disse a raposa. Mas tu não a deves esquecer. Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas. Tu és responsável pela rosa...
Eis aí um mistério bem grande.*

- Eu sou responsável pela minha rosa... repetiu o príncipezinho, a fim de se lembrar."

(Trecho do livro O Pequeno Príncipe - Antoine De Saint-Exupery)

SUMÁRIO

RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. Introdução	20
2. Objetivos	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. Revisão Bibliográfica	24
3.1 Proteínas do leite	24
3.2 Ensaio imunológico e avaliação da antigenicidade de proteínas do soro de leite.....	25
3.3 Estratégias para redução da antigenicidade das proteínas do soro de leite	29
3.4 Reações com Transglutaminase.....	33
4. Material e Métodos	39
4.1 Material.....	39
4.2. Obtenção e caracterização da β -Lg polimerizada	41
4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	43
4.4 Solubilidade.....	43
4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)	43
4.6 Grau de polimerização nas amostras.....	44
4.7 Ensaio biológico	45
4.7.1 Animais.....	46
4.7.2 Fase de sensibilização	46
4.8 Ensaio Imunológico	47
4.8.1 <i>Immunoblotting</i>	47
4.8.2 ELISA – Análise dos níveis séricos de imunoglobulinas	48
4.9 Análise Estatística	50
5. Resultados e Discussão	51
5.1 Caracterização da β -Lactoglobulina.....	51
5.2 Polimerização da β -Lg.....	52

5.2.1 Influência do tratamento térmico na polimerização da β -Lg	52
5.2.2 Influência do agente redutor Cys na polimerização da β -Lg.....	61
5.3 Avaliação da Antigenicidade	70
6. Conclusões	83
7. Referências Bibliográficas	84

LISTA DE ABREVIATURAS

α-La	Alfa-lactalbumina
Alúmen	Hidróxido de alumínio 3%
β-Lg	Beta-lactoglobulina
βLg-n	Beta-lactoglobulina nativa
βLg TT TG	Beta-lactoglobulina tratada termicamente e polimerizada com transglutaminase
BSA	Soroalbumina bovina
CPS	Concentrado protéico do soro de leite
CT	Grupo controle
Cys	Cisteína
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular
DTT	Ditionitrito
IPS	Isolado protéico do soro de leite
LF	Lactoferrina
Lys	Lisina
MM	Massa molar
PBS	Solução salina fosfatada
SDS- PAGE	Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida
SH	Sulfrídrico livre
S-S	Ponte dissulfeto
TMB	Tetrametilbenzidina
TG	Transglutaminase
TT	Tratada termicamente
Val	Valina

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reações catalisadas pela transglutaminase. (a) Formação de ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina de proteínas e peptídeos (b) incorporação de aminas (c) deaminação (adaptado de JONG e KOPPELMAN, 2002). 34
- Figura 2.** Possível mecanismo de ação catalisada pela transglutaminase após tratamento da proteína com agente redutor, na formação de estruturas protéicas mais compactas (adaptado de EISSA e KHAN, 2006). 36
- Figura 3.** Fluxograma geral do experimento. 40
- Figura 4.** Curva padrão para CLAE-EM obtida com os marcadores da Bio-Rad (1,35 a 670 kDa). 44
- Figura 5.** Fluxograma do planejamento dos ensaios biológico e imunológico. 45
- Figura 6.** Fluxograma do protocolo experimental. 47
- Figura 7.** Perfil eletroforético da β -Lg nativa. A: SDS-PAGE, gel de poli(acrilamida) de 4 a 15%. Coluna 1: padrão massa molar (14,4-97,4 kDa), B: CLAE-EM (1mg/mL) em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0), fluxo de 0,8 mL/min, absorvância à 280 nm. 51
- Figura 8.** Perfil eletroforético da transglutaminase, em SDS-PAGE. Coluna1: padrão massa molar (14,4-97,4 kDa), coluna 2: enzima TG. 52
- Figura 9.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE em gel de poli(acrilamida) com gradiente de 4 a 15%, em meio redutor). A) β -Lg 3% TT; B) β -Lg 5% TT; C) β -Lg 7% TT. Coluna 1: TG 50 U/g, coluna 2: TG 25 U/g; coluna 3: TG 10 U/g; coluna 4 TG: 5 U/g, coluna 5A, 5B e 5C: padrão massa molar (14,4-97,4 kDa). Os gráficos à direita mostram concentração relativa de produtos com massa molar de 14 a 40 kDa, 41 a 100 kDa e > 100 kDa., obtidas por densitometria. 54
- Figura 10.** Perfil cromatográfico (CLAE-EM) das amostras da β -Lg (tratada termicamente a 80 °C/60 min e polimerizada com a enzima transglutaminase (50 °C, pH 8,0, 180 min). A e D: β -Lg 3%TT, B e D: β -Lg 5%TT, C e F: β -Lg 7%TT, em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0), fluxo de 0,8 mL/min, absorvância à 280 nm. A-C: amostras polimerizadas com 10U TG/g proteína; D-F amostras polimerizadas com 25U TG/g proteína. 56
- Figura 11.** Solubilidade das amostras de β -Lg tratada termicamente à 80 °C e polimerizada com TG (50 °C/180 min, pH 8,0) em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0), absorvância à 280 nm. 58
- Figura 12.** Grau de polimerização das amostras de β -Lg desnaturadas termicamente à 80 °C e tratadas com TG (U/g de proteína) a partir de: A: eletroforese SDS-PAGE e B: CLAE-EM. Condições de reação com TG: 50 °C/180 min, pH 8,0. 59

- Figura 13.** Perfil eletroforético SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida de gradiente 4 a 15%, em meio redutor. A: β -Lg 3%; B: β -Lg 5%; C: β -Lg 7%. Coluna 1: TG 25 U/g + Cys 0,4 mol/L; coluna 2: TG 25 U/g + Cys 0,25 M; coluna 3: TG 25 U/g + Cys 0,1 M; coluna 4: TG 25U/g + Cys 0,05 M. Coluna 5A: β -Lg 3% TG 25U; colunas 5C e 6A: β -Lg TT 50 °C; colunas 6B e 6C e 7A: padrão massa molar (14,4 - 97,4 kDa). Os gráficos à direita mostram concentração relativa de produtos com massa molar de 14 a 40 kDa, 41 a 100 kDa e, > 100 kDa., obtida por densitometria das bandas. 62
- Figura 14.** Perfil CLAE-EM da β -Lg, polimerizada com TG (25 U/g à 50 °C/180 min, pH 8,0) na presença de agente redutor Cys 0,1M (coluna da esquerda) e 0,25 mol/L (coluna da direita), em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0), fluxo de 0,8 mL/min, absorvância à 280 nm. A e D: β -Lg 3%, B e E: β -Lg 5%, C e F: β -Lg 7%. 65
- Figura 15.** Solubilidade das amostras β -Lg polimerizadas com TG (25U/g à 50 °C/180 min, pH 8,0) na presença de agente redutor Cys, em tampão fosfato de sódio (10mM, pH 7,0), concentração de 1mg de proteína/mL, absorvância à 280 nm. 66
- Figura 16.** Avaliação da formação de polímeros (MM > 100 kDa) nas amostras β -Lg tratadas com TG (25 U/g à 50 °C/180 min, pH 8,0) na presença de agente redutor Cys (mol/L) a partir de análise A: eletroforese SDS-PAGE e B: CLAE-EM. 68
- Figura 17.** Análise de IgE nos soros dos animais imunizados com (a): CT salina; (b):CT alúmen; (c): CT TG; (d): β Lg-n; (e): β Lg TT TG; (f): β Lg Cys TG , avaliados contra: β Lg-n (coluna 1); β -Lg TT TG (coluna 2); β -Lg Cys TG (coluna 3); TG (coluna 4)..... 71
- Figura 18.** Análise de IgG nos soros dos animais imunizados com (a): CT salina; (b): CT alúmen; (c): CT TG; (d): β Lg-n; (e): β Lg TT TG; (f): β Lg Cys TG , avaliados contra: β Lg-n (coluna 1); β Lg TT TG (coluna 2); β Lg Cys TG (coluna 3); TG (coluna 4). 73
- Figura 19.** Níveis séricos de IgE no soro de animais imunizados com a proteína nativa (β Lg-n), tratada termicamente e polimerizada com TG (β Lg TG) e polimerizada na presença de Cys (β Lg Cys TG) avaliados contra (A): β Lg-n, (B): β Lg TG, (C): β Lg Cys TG. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). 76
- Figura 20.** Gráfico representativo da produção de IgE específica frente à proteína utilizada na imunização de cada grupo de animais. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). 77
- Figura 21.** Níveis séricos de IgG no soro de animais imunizados com a proteína nativa (β Lg-n), tratada termicamente e polimerizada com TG (β Lg TG), polimerizada na presença de Cys (β Lg Cys TG) e grupos CT TG, alúmen e salina, avaliados contra (A): β Lg-n, (B): β Lg TG, (C): β Lg Cys TG. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). 78

Figura 22. Gráfico representativo da produção de IgG específica frente à proteína utilizada na imunização de cada grupo de animais. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). 80

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Condições experimentais do tratamento das amostras de β -Lg com transglutaminase e nomenclatura das amostras. 42
- Tabela 2.** Condições experimentais do tratamento das amostras de β -Lg com transglutaminase (25 U/g) na presença de agente redutor-Cys e nomenclatura das amostras. 42
- Tabela 3.** Níveis séricos de IgE específica nos animais dos grupos controles imunizados com enzima TG, alúmen e salina. 75

RESUMO

O leite bovino contém várias proteínas que são consideradas antigênicas e capazes de induzir resposta imune, dentre elas, a β -lactoglobulina (β -Lg) é uma das mais antigênicas. A enzima transglutaminase (TG) é a única enzima utilizada comercialmente que catalisa reação de ligação cruzada inter ou intramolecular em diversas proteínas, formando polímeros de alta massa molar. Até o momento, pouco se conhece sobre a modificação dos epítomos antigênicos na estrutura das proteínas do soro de leite modificada ou polimerizada pela enzima TG. O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito da reação de polimerização induzida pela TG na atividade antigênica da β -Lg.

A modificação da β -Lg com a TG foi realizada em dois experimentos: (1) a β -Lg foi tratada termicamente (80 °C/60 min) em diferentes concentrações (3, 5 e 7%) e polimerizada com TG (5, 10, 25 e 50 U/g de proteína) e (2) a β -Lg (3, 5 e 7%) foi polimerizada com TG 25 U/g de proteína na presença de agente redutor Cys nas concentrações 0,05, 0,1, 0,25 e 0,4 mol/L. A caracterização da β -Lg polimerizada foi realizada por eletroforese (SDS-PAGE) e cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM). A antigenicidade da proteína foi avaliada por métodos imunquímicos, utilizando soro de camundongos BALB/c e técnicas de *Immunoblotting* e ELISA.

Quando a β -Lg 3% foi tratada termicamente e polimerizada com TG, 40% da β -Lg permaneceu nas formas monomérica e dimérica. Já as amostras tratadas com maior concentração de proteína (5% e 7%) apresentaram de 70% a 87% de material com massa molar (MM) > 100 kDa, sendo que β -Lg 7% polimerizada com 25U TG/g foi a que apresentou maior grau de polimerização. Na presença de Cys, observou-se maior percentual de produtos com MM > 100 kDa que o obtido com o tratamento térmico. Nas amostras β -Lg 5% e β -Lg 7%, a presença da Cys possivelmente aumentou a susceptibilidade da β -Lg à polimerização.

As amostras selecionadas para avaliação da antigenicidade foram β -Lg nativa, β -Lg 7% tratada termicamente e polimerizada com 25U TG/g de proteína (β -Lg 7% TT 25TG) e β -Lg 7% polimerizada com 25 U/g de proteína na presença de Cys 0,25 mol/L (β -Lg 7% 0,25Cys TG). Os resultados mostraram que os animais sensibilizados com β -Lg polimerizada na presença de agente redutor Cys apresentaram níveis séricos de IgE e IgG menores, comparados aos grupos imunizados com β -Lg nativa e β -Lg tratada termicamente e polimerizada com TG, sugerindo que a polimerização na presença de agente redutor Cys pode reduzir o potencial antigênico da proteína ao modificar e/ou ocultar regiões de epítopos na proteína.

ABSTRACT

The bovine milk contains several proteins that are considered antigenic and capable of inducing immune responses, among them β -lactoglobulin (β -Lg) is one of the most antigenic protein. The enzyme transglutaminase (TG) is the only enzyme commercially used that catalyzes reaction of crosslinking inter or intramolecular in several proteins, forming polymer of high molecular mass. Up to now, little is known about modification of epitopes of whey proteins by the TG. The present study examines the effect of the polymerization reaction induced by TG on the antigenic activity of β -Lg.

The β -Lg was modified by TG in two experiments: **(1)** β -Lg was heat treated (80 °C/60 min) at different concentrations (3, 5 and 7%) and modified with TG (5, 10, 25 and 50U / g protein), and **(2)** β -Lg (3, 5 and 7%) was modified with TG 25U / g of protein in the presence of reducing agent Cys (0.05, 0.1, 0.25, 0.4 mol/L). The characterization of the modified β -Lg was performed by electrophoresis (SDS-PAGE) and high performance liquid chromatography molecular exclusion (HPLC-MS). The antigenicity of the protein was measured by Immunoblotting and ELISA, using serum from BALB/c mice.

When β -Lg 3% was heat treated and modified by TG, 40% of the β -Lg remained as monomeric and dimeric forms. However, the samples treated at higher protein concentration (5% and 7%) showed 70% to 87% of material with molecular weight > 100 kDa. β -Lg 7% modified with 25U TG / g presented the greatest degree of polymerization. In the presence of Cys, higher percentage of products with MW > 100 kDa was obtained than with the previous heat treatment. The presence of Cys increased the susceptibility of β -Lg for polymerization, especially those treated at protein 5 and 7% concentrations.

The samples selected for evaluation of the antigenicity were native β -Lg, 7% β -Lg treated with 25U TG / g of protein (β -Lg 7% TT 25TG) and 7% β -Lg treated

with 25U TG / g protein in the presence of Cys 0.25 mol / L (β -Lg 7% 0.25 Cys TG). The results showed that animals sensitized with β -Lg in the presence of reducing the agent Cys had lower levels of IgG and IgE, compared to the groups immunized with native β -Lg and β -Lg treated with high temperature and modified with TG, suggesting that the polymerization in the presence of reducing agent Cys can modify or hide epitopes and reduce the potential antigenic of the protein.

1. Introdução

Hipócrates está entre os primeiros a registrar reações adversas a alimentos, há mais de 2000 anos (SHILS et al., 2003). Loveless (1950 *apud* SHILS et al., 2003) relatou a primeira intervenção alimentar: um estudo cego controlado com placebo para avaliar a alergia ao leite, envolvendo oito pacientes e outro envolvendo 25 pacientes para determinar a sensibilidade ao amido.

Alergia alimentar é caracterizada por resposta imunológica anormal a algum tipo de alimento ou componente nele encontrado. Representa um problema importante de saúde, especialmente em países industrializados, onde se estima que afeta de 1 a 2% da população adulta e até 8% das crianças com idade abaixo de três anos (HELM e BURKS, 2000).

Os alimentos ingeridos na vida diária constituem a carga antigênica exógena mais ampla a qual os seres humanos estão sujeitos. Em indivíduos alérgicos a alimentos, ocorre a produção de anticorpos IgE (imunoglobulina E) específicos aos antígenos alimentares e/ou respostas anormais das células T. Manifestações clínicas de alergia alimentar consistem de desordens no trato digestório ou no organismo como resultado da reação imunológica. O aumento do interesse na área de alergias alimentares reflete a expansão desta patologia na população (SHILS et al., 2003).

Entre os alimentos potencialmente alergênicos, o leite bovino é um dos mais comuns. Do ponto de vista imunológico, é a reação aos componentes do leite mediada por IgE, podendo levar às reações cutâneas (dermatite atópica, urticária), respiratórias (rinite, asma) e gastrointestinais (vômito, diarreia, cólica, refluxo gastroesofágico) e, em casos extremos, choque anafilático (MONACI et al., 2006).

Numerosos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes tipos de tratamentos físicos, químicos e enzimáticos na redução da

antigenicidade das proteínas do soro de leite. O tratamento térmico é um dos métodos utilizados, embora haja controvérsias sobre a redução do potencial alergênico. A alteração na conformação dos epítomos ou determinantes antigênicos como resultado da perda da estrutura terciária, pode reduzir o potencial alergênico da proteína (MONACI et al., 2006). Kleber et al. (2004) verificaram que a desnaturação térmica e subsequente agregação podem impedir a ligação de anticorpos específicos aos epítomos na estrutura. Por outro lado, o tratamento térmico pode aumentar a alergenicidade, ao dar origem a novos antígenos como consequência de reações químicas e físicas (KLEBER et al., 2004).

O processo de hidrólise de proteínas por enzimas também é utilizado para prevenir a sensibilidade a alguns produtos e a indução da resposta antigênica (PAHUD et al., 1985). Asselin et al. (1989) verificaram que a proteólise com pepsina seguida pela α -quimotripsina foi eficiente na redução da alergenicidade da α -La e β -Lg, adequada para utilização em fórmulas infantis para crianças alérgicas as proteínas do leite. No entanto, fórmulas de hidrolisados podem apresentar imunorreatividade residual possivelmente devido à incapacidade da reação hidrolítica atingir toda a seqüência de epítomos, mesmo na proteína desnaturada (BONOMI et al., 2003).

Estudos mostram redução da antigenicidade das proteínas do leite por aplicação de alta pressão (VAN BERESTEIJN et al., 1995; PEÑAS et al., 2005), irradiação (LEE et al. 2001) e ainda pela fermentação ácido-láctica do leite (JEDRYCHOWSKI e WROBLEWSKA, 1999; VILJANEN et al., 2005).

Outro processo para redução da antigenicidade das proteínas, que começou a ser explorado mais recentemente, é a utilização da enzima transglutaminase (TG). Redução da antigenicidade de proteínas da soja (BABIKER et al., 1998) e trigo (WATANABE et al., 1994) foi observada após tratamento térmico e modificação com a TG.

A TG é a única enzima utilizada comercialmente na indústria de alimentos que catalisa a conversão de proteínas em polímeros de alta massa molar através de ligações cruzadas covalentes (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006). A capacidade da TG de introduzir ligações cruzadas inter e intra moleculares tem sido amplamente utilizada para modificação das propriedades funcionais de proteínas em alimentos tais como solubilidade, formação de géis e filmes e polimerização de peptídeos homólogos e heterólogos. (JAROS et al., 2006).

Proteínas provenientes da soja, soro de leite bovino, glúten e carne podem ser modificadas pela enzima TG (ZHU et al., 1995; MOTOKI et al., 1984; JAROS et al., 2006). As proteínas do soro de leite não são consideradas bons substratos para ação desta enzima, a menos que haja tratamento prévio com agentes redutores como o dithiothreitol (DTT) ou desnaturação térmica da proteína, que aumentam a reatividade principalmente da β -Lg (TANG e MA, 2007).

Embora tratamentos físicos, químicos ou enzimáticos venham sendo utilizados para reduzir o potencial antigênico das proteínas do soro de leite, não foram encontrados trabalhos sobre o efeito da ação da TG na antigenicidade das proteínas do leite, em especial da β -Lg.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito da reação de polimerização induzida pela transglutaminase na avaliação da atividade antigênica da β -Lg.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar a β -Lg polimerizada com a enzima transglutaminase, tratada termicamente e quando associada a um agente redutor;
- Avaliar a antigenicidade da β -Lg nativa, enzima TG e β -Lg modificada enzimaticamente pela TG na presença ou não de Cys.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Proteínas do leite

O leite de vaca tem aproximadamente 3,5% de proteínas, sendo 2,9% caseína e 0,6% proteínas de soro. Caseína pode ser definida como a proteína precipitada por acidificação do leite desnatado a pH 4,6/20 °C. O líquido remanescente é o soro, que contém cerca de 20% das proteínas do leite. A α -La e β -Lg perfazem 70-80% das proteínas do soro. Além dessas, são encontradas a soroalbumina (BSA), lactoferrina (LF), imunoglobulinas, proteose-peptonas, transferrina e enzimas. (SGARBIERI, 1996).

O soro de leite pode ser obtido em laboratório ou na indústria principalmente por três processos: coagulação enzimática, resultando no coágulo de caseína; precipitação ácida no pH isoeletrico, resultando na caseína isoeletrica, que é transformada em caseinatos e no soro ácido; separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se concentrado de micelas e as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado protéico (ZINSLY et al., 2001).

A β -Lg é a proteína mais abundante do soro de leite, representando 50% do total das proteínas que constituem esta fração (MONACI et al., 2006). É uma proteína globular, constituída por 162 aminoácidos, contém um grupo sulfidril livre (-SH) e duas pontes dissulfeto intramolecular (-S-S-), ligando a Cys⁶⁶ – Cys¹⁶⁰ e Cys¹⁰⁶ – Cys¹¹⁹. A estrutura secundária consiste de folhas- β antiparalelas formadas por nove cordas- β (β -strands). A estrutura cristalina mostra que o monômero (MM ~ 18,3 kDa) consiste predominantemente de folhas- β (50%) e uma pequena porção de α -hélice (15%), estruturas ao acaso (15%) e estruturas em volta ou *turns* (20%) (PAPIZ et al., 1986; MONACO et al., 1987; BROWNLOW et al., 1997).

Da mesma forma que as demais proteínas do soro de leite, a β -Lg sofre desnaturação térmica pelo aquecimento a temperaturas superiores a 60 °C. A 95 °C há completa desnaturação da β -Lg, que sofre extensa transformação

conformacional, com exposição de grupos nucleofílicos altamente reativos e de áreas hidrofóbicas (SGARBIERI, 1996).

A α -La, é uma proteína monomérica globular, com massa molar 14,2 kDa, representando aproximadamente 25% das proteínas do soro de leite. Caracteriza-se pela tendência a formar associações em pH abaixo do seu ponto isoelétrico, além de apresentar alta afinidade para ligação com íons cálcio, levando à maior estabilidade da estrutura secundária desta proteína (MONACI et al. 2006).

A BSA, com MM 66,4 kDa, é responsável por aproximadamente 5% do total das proteínas do soro de leite. Apresenta um grupo sulfidrila livre na posição 34 (N-terminal) e 17 pontes dissulfeto intramolecular (CARTER, 1994). Muitas dessas ligações dissulfeto são protegidas no núcleo da proteína e, conseqüentemente, não são facilmente acessíveis (RESTANI et al., 2004).

A LF é uma metaloproteína, com MM 76 kDa, que se liga fortemente a dois átomos de ferro por mole de proteína. Tem característica básica, com ponto isoelétrico (pI) ao redor de pH 8,0. Com o conteúdo normal de ferro, esta proteína é bastante resistente à desnaturação térmica e química e à ação enzimática. (SGARBIERI, 1996).

3.2 Ensaio imunológico e avaliação da antigenicidade de proteínas do soro de leite

A composição e seqüência da unidade estrutural individual da macromolécula são conhecidas como estrutura primária. Quando a seqüência destas unidades confere antigenicidade à molécula, esta é denominada determinante seqüencial antigênico. Os determinantes antigênicos conformacionais são resultado das estruturas secundária, terciária e quaternária das moléculas. Moléculas mais complexas, como as proteínas do leite, apresentam ambos determinantes, seqüenciais e conformacionais (BARRET, 1988).

O leite bovino contém várias proteínas que são consideradas antigênicas e capazes de induzir resposta imune. Em estudo realizado com pacientes alérgicos, verificou-se que as proteínas mais abundantes no leite, especialmente a β -Lg, caseínas e α -La, são as mais alergênicas (MONACI et al., 2006).

Otani et al. (1985) e Kurisaki et al. (1982) mostraram que a estrutura terciária da β -Lg era um fator importante para sua imunorreatividade. Clement et al. (2002) realizaram estudo sobre a antigenicidade da β -Lg, utilizando anticorpos monoclonais (mAb). Os autores verificaram que havia regiões antigênicas não só na α -hélice e fitas externas, mas também as folhas- β continham determinantes antigênicos, também denominados epítomos.

A β -Lg pode promover reações alérgicas mesmo quando presente em baixas concentrações (PUERTA et al., 2006). Em estudo no qual foram avaliados 20 indivíduos alérgicos ao leite bovino, foi verificado que a maioria das proteínas encontradas neste alimento estava envolvida no processo alérgico em diferentes extensões e que alguns pacientes podiam ser sensibilizados por proteínas presentes em traços, tais como BSA e LF. (MONACI et al., 2006).

Natale et al. (2004) avaliaram 20 indivíduos alérgicos com o propósito de verificar os principais componentes alergênicos do leite bovino. Todos os pacientes foram positivos ao teste cutâneo e tiveram sensibilidade a uma ou mais frações de caseína. IgE específicas para β -Lg e BSA foram detectadas em 45% dos pacientes .

Wal (2001) verificou que os epítomos reconhecidos por mais de 90% dos pacientes foram os fragmentos da B-Lg f(41-60), f(102-124) e f(149-162), cada um contribuindo com aproximadamente 10 – 15% da imunorreatividade da proteína intacta.

Os linfócitos B contribuem com a resposta imune adaptativa ou específica por meio da secreção de anticorpos, e sua resposta a um imunógeno injetado, é em geral, medida pela análise do anticorpo específico produzido em uma resposta

imune humoral. A análise é realizada por um ensaio para o anticorpo que se acumula na fase líquida do sangue (soro ou plasma): estes anticorpos são chamados de anticorpos circulantes (HUDSON e RAY, 1989).

As características mais importantes da resposta dos anticorpos são a especificidade, quantidade, o isotipo ou classe e a afinidade dos anticorpos produzidos. Estas características do anticorpo no anti-soro obtido são então determinadas usando alguns ensaios imunoquímicos como RAST, *enzyme allergosorbente tests* (EAST), *rocket immuno-electrophoresis* (RIE), *immunoblotting*, ensaio imunoenzimático (ELISA) e radioensaio (RIA), aplicáveis para detecção qualitativa e quantitativa de componentes alimentares e verificação da presença de proteínas potencialmente alergênicas (HUDSON e RAY, 1989, MONACI et al., 2006).

Os testes imunoquímicos não clínicos são utilizados para estimar a antigenicidade e a imunogenicidade do produto. Antigenicidade é definida em termos da reatividade específica ao anticorpo pré-formado, enquanto a imunogenicidade se refere à indução da resposta imune em um hospedeiro não sensibilizado (CORDLE et al., 1994).

O teste ELISA é o método comumente utilizado em laboratórios e indústria de alimentos que detecta, por reação colorimétrica, ligação entre antígeno e anticorpo. A concentração do complexo antígeno-anticorpo pode ser estimada com base em uma curva padrão gerada com quantidades conhecidas de anticorpo purificado. Existem dois tipos de ELISA: competitivo e sanduíche, sendo o último o mais aplicado para a detecção de alérgenos alimentares (POMS, KLEIN, ANKLAM; 2004; KOPPELMAN, HEFLE, 2006; MONACI et al., 2006)

Anticorpo anti- β -Lg purificada foi utilizado para desenvolvimento de teste ELISA tipo sanduíche sensível para determinação de níveis muito baixos de β -Lg em fórmulas infantis, com limite de detecção por volta de 0,002 ng/ml (MAKINEN e PALOSOU, 1992).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido por *immunoblotting* em membrana de nitrocelulose representa um procedimento padrão para separação e identificação de proteínas/alérgenos (POMS, KLEIN, ANKLAM; 2004). O immunoblotting pode ser usado para a identificação de uma proteína em um lisado celular e evita a necessidade de marcar grandes quantidades de células com radioisótopos. As células não marcadas são colocadas em detergente para solubilizar todas as proteínas celulares, e o lisado é submetido à SDS-PAGE para separar as proteínas que então são transferidas do gel para um suporte estável, tal como papel ou membrana de nitrocelulose. Proteínas específicas podem ser detectadas por anticorpos capazes de reagir com proteínas solubilizadas por SDS, os anticorpos ligados são revelados com anticorpos antiimunoglobulina marcados com radioisótopos ou uma enzima (JANEWAY et al., 2002).

O modelo experimental mais utilizado em estudos da avaliação de componentes alergênicos em alimentos são os camundongos (ADEL-PATIENT et al. 2000; BERNARD et al. 2000). Gaudry et al. (2004) verificaram que a resposta de anticorpos das classes IgE e IgG para amendoim, camarão, castanha e castanha de caju em camundongos BALB/c apresentaram similaridade significativa aos encontrados em indivíduos alérgicos.

Estudo sobre a antigenicidade das proteínas do concentrado protéico do soro de leite (WRÓŚLEWSKA e JEDRYCHOWSKI, 2005) utilizando camundongos BALB/c e ensaio por ELISA mostrou que animais sensibilizados com β -Lg e posteriormente alimentados com isolado protéico do soro de leite (IPS) produziram IgG anti- β -Lg, indicando que a administração intraperitoneal de β -Lg causou imunoestimulação do organismo contra esta proteína.

Mizumachi e Kurisaki (2002) alimentaram camundongos BALB/c por 58 dias consecutivos com β -Lg incorporada com adjuvante completo de Freund para avaliar a resposta imune. Os autores observaram que a alimentação contínua com a proteína induziu a supressão da resposta de citocinas alérgicas (Th2) devido à tolerância oral adquirida pelos animais neste período.

O mecanismo de resposta alérgica aguda e tardia foi mostrado por Adel-Pacient et al. (2003). Camundongos fêmeas BALB/c foram sensibilizados intraperitonealmente com β -Lg desnaturada contendo epítomos lineares e tiveram produção aumentada de mediadores inflamatórios (leucotrienos e histamina) e na secreção de muco, IL-4 e IL-5 e exsudato de plasma, indicando que a proteína levou à resposta alérgica aguda e tardia nestes animais.

3.3 Estratégias para redução da antigenicidade das proteínas do soro de leite

Além da demanda por longa estabilidade e alto valor nutritivo, esforços têm sido feitos para diminuir o potencial alergênico de produtos derivados do leite. Duas diferentes estratégias são comumente aplicadas pela indústria de alimentos: desnaturação térmica e hidrólise das proteínas (MONACI et.al., 2006).

O tratamento térmico, método mais comum para eliminar patógenos, apresenta resultados controversos em relação à redução da resposta alergênica. Diferenças na alergenicidade das proteínas do leite não dependem somente da temperatura e tempo de aquecimento, mas também das possíveis interações com outras proteínas ou componentes da matriz do alimento. A desnaturação térmica pode alterar a conformação dos epítomos como resultado da perda da estrutura terciária, conseqüentemente reduzindo o potencial alergênico (MONACI et. al., 2006).

Mierzejewska e Kubicka (2006) verificaram que com tratamentos na faixa de temperatura entre 65 e 80 °C ocorreu diminuição da imunorreatividade da β -Lg, o que contribuiu para a redução do potencial imunorreativo do soro de leite.

Em estudo conduzido por Kleber et al. (2004), a antigenicidade mais elevada da β -Lg foi detectada quando previamente tratada a temperaturas entre 75 e 90 °C. O tempo de aquecimento também foi determinante na indução da resposta antigênica, pois com tratamento a 90 °C/1 min foi observado pequeno aumento da resposta, que aumentou rapidamente depois de 35 min de tratamento térmico até atingir o valor de 76 mg/ml equivalente de β -Lg. A diminuição da

resposta antigênica detectada após tratamento térmico a 148 °C foi atribuída às alterações na β -Lg, tais como exposição de grupos SH, seguida do processo de agregação com rearranjo intermolecular.

Agregados podem apresentar características de estruturas internas distintas quando diferentes condições de aquecimento são utilizadas, resultando em diferentes graus de antigenicidade, quando avaliada *in vitro* (SPIEGEL et al., 2002). Spiegel et al. (2002) observaram aumento da antigenicidade com o prolongamento do tempo de aquecimento a 90 °C. No entanto, a resposta antigênica diminuiu devido ao aumento do tamanho das partículas e de agregados formados quando a temperatura de aquecimento excedeu 90 °C. Resultados semelhantes foram obtidos por Merzejewska e Kubicka (2006), que observaram aumento da imunorreatividade da β -Lg nos primeiros minutos de tratamento a 90 e 100 °C. O aumento da imunorreatividade da β -Lg sob estas condições pode ser decorrente da exposição de epítomos intramoleculares devido ao desdobramento da cadeia polipeptídica ou mesmo à formação de novos sítios antigênicos. Sob temperaturas elevadas, as colisões entre as moléculas são mais freqüentes, formando agregados mais compactos e densos. Desta forma, os anticorpos somente terão acesso aos epítomos localizados nas superfícies das partículas agregadas, resultando na redução da resposta antigênica (KLEBER et al., 2004).

Kleber et al. (2004) verificaram que durante tratamento térmico em pH neutro as estruturas terciárias e quaternárias da β -Lg são modificadas e pontes dissulfeto entre β -Lg e caseína são formadas. Como consequência, a disponibilidade ou exposição de epítomos da β -Lg é menor, levando a redução da resposta antigênica. Adicionalmente, a reação de Maillard entre a β -Lg e açúcares redutores como glicose, galactose ou lactose também pode modificar as regiões dos epítomos, contribuindo para redução da antigenicidade da proteína (MORGAN et al., 1998).

Além do processamento térmico, o processo de hidrólise de proteínas por enzimas específicas também é utilizado para prevenir a sensibilidade a alguns produtos e indução da resposta antigênica (PAHUD et al., 1985).

A especificidade enzimática é um fator muito importante no processo de hidrólise, pois a posição de clivagem das ligações peptídicas resulta em fragmentos protéicos com diferentes seqüências aminoacídicas. Esta especificidade influi na degradação dos epítomos responsáveis pelas reações imunológicas e também na formação de peptídeos amargos (PACHECO et al., 2005).

Asselin et al. (1989), ao avaliarem os efeitos da proteólise *in vitro* sobre a alergenicidade das proteínas principais do soro lácteo, destacaram a importância da enzima péptica e provavelmente da secreção ácida do sistema digestório na desnaturação e/ou degradação destas proteínas. A proteólise com pepsina seguida pela α -quimotripsina foi indicada como a combinação de enzimas mais eficiente para reduzir a alergenicidade da α -La e β -Lg e que o hidrolisado obtido poderia ser considerado um ingrediente adequado para ser aplicado às fórmulas infantis de baixa alergenicidade (ASSELIN et al., 1989).

A estrutura terciária da β -Lg tem conformação espacial rígida, apresentando resistência elevada à digestão gástrica, o que poderia explicar, ao menos em parte, a sua alergenicidade (PAPIZ et al., 1986). Sélo et al. (1999) utilizaram a digestão por tripsina para investigar a alergenicidade da β -Lg e verificaram que há vários epítomos alergênicos em toda a extensão da estrutura da β -Lg. Os peptídeos reconhecidos por 97, 92 e 89% dos indivíduos alérgicos foram fragmentos AA103-124, AA41-60 e AA149-162, respectivamente. Um segundo grupo de peptídeos, AA1-8, AA25-40, AA92-100, foi reconhecido por 72% dos indivíduos e, o último grupo, contendo os peptídeos AA9-14, AA84-91 e AA92-100, foi reconhecido por 40% dos indivíduos.

Estudos sobre a ligação da β -Lg com a IgE mostraram que esta imunoglobulina se eleva na presença de um epítomo de cadeia linear curta (Val⁹² –

Lys¹⁰⁰), localizado no centro hidrofóbico da molécula de proteína, inacessível no estado nativo (WAL, 2001; SELO et al., 1999). Mesmo após hidrólise da β -Lg com enzimas digestivas, pode haver exposição de peptídeos alergênicos ocultos, os quais podem ser reconhecidos por IgE específicas do plasma de indivíduos alérgicos, causando reação adversa (SÉLO et al., 1999).

Van Beresteijn et al. (1994), ao avaliarem as propriedades imunológicas de hidrolisados de proteínas de soro lácteo através dos métodos ELISA (enzyme-linked immunosorbente assays), PCA (Anafilaxia Cutânea Passiva) e choque anafilático, verificaram que a massa molar mínima para provocar imunogenicidade e alergenicidade está entre 3 e 5 kDa. Taylor et al. (1987) consideram que a massa molar de 10 kDa representa o limite mínimo para uma resposta imunogênica. Ferguson (1984) observou que a maioria dos alérgenos alimentares apresentam massa molar na faixa de 18 a 36 kDa, enquanto Taudorf et al. (1984) os considera na faixa de 10-50 kDa.

Embora várias fórmulas de hidrolisados tenham sido desenvolvidas para diminuir ou mesmo eliminar a antigenicidade de proteínas do leite, fórmulas com proteínas parcial ou extensivamente podem apresentar atividade antigênica residual em hidrolisadas (RESTANI et al., 1995). Esta imunorreatividade residual possivelmente se origina da incapacidade da reação hidrolítica atingir toda a seqüência de epítomos, mesmo na proteína desnaturada (BONOMI et al., 2003).

A irradiação de alimentos também foi considerada um processo potencialmente viável para redução da alergenicidade dos componentes do leite. Lee et al. (2001) avaliaram a aplicação da tecnologia de irradiação alimentar como método para reduzir a alergia provocada pelo leite. Tratando caseína e β -Lg com irradiação gama, houve diminuição das propriedades alergênicas e antigênicas *in vitro*, avaliada pelo método ELISA. Os autores sugeriram que a diminuição das propriedades alergênicas seria resultado de mudanças estruturais das proteínas e possível mascaramento dos epítomos devido à agregação molecular.

Tratamento com alta pressão é outra técnica que tem sido estudada em conjunto com hidrólise enzimática, sendo considerada uma alternativa viável para substituição do tratamento térmico para redução da alergenicidade (PEÑAS et al., 2005).

A redução da antigenicidade pela combinação dos tratamentos enzimático e pressão está relacionada tanto à modificação da estrutura das proteínas como especificidade da enzima utilizada para eliminar a seqüência de epítomos (VAN BERESTEIJN et al., 1995). Desta forma, a estrutura desdobrada e o processo de desnaturação das proteínas do soro do leite induzidas pela aplicação de alta pressão poderiam favorecer a exposição conformacional dos epítomos antigênicos para a ação das proteases, uma vez que a pressurização altera a estrutura da molécula facilitando a hidrólise e reduzindo a antigenicidade da proteína. (DUMAY et al., 1994).

Van Berestijn et al. (1995) avaliaram a antigenicidade dos hidrolisados obtidos com os diferentes sistemas enzimáticos por meio do teste ELISA e observaram redução significativa da antigenicidade quando se utilizou corolase PN-L e neutrase em combinação com o tratamento com pressão de 300 Mpa antes e durante a hidrólise enzimática..

Outra técnica que tem sido utilizada visando a redução da alergenicidade das proteínas baseia-se na fermentação ácido-láctica utilizando-se diferentes espécies de bactérias (meso e termofílicas) (JEDRYCHOWSKI e WROBLEWSKA, 1999). Baseado em trabalhos que demonstram os efeitos benéficos na redução dos sintomas de pacientes alérgicos, os probióticos podem ser uma inovação na prevenção e terapia através de fórmulas hipoalergênicas (VILJANEN et al., 2005).

3.4 Reações com Transglutaminase

Transglutaminase (TG; EC 2.3.2.13) é a única enzima utilizada comercialmente na indústria de alimentos que catalisa reações de ligação cruzada inter ou intramolecular em diversas proteínas. A TG catalisa reação de acil transferência, introduzindo uma ligação covalente entre os resíduos de glutamina

e uma grande variedade de aminas primárias (FOLK e FINLAYSON, 1977). Quando resíduos de lisina agem como acil receptores, a reação leva a formação de ligação isopeptídica ϵ -(γ -glutamil)lisina. Na Figura 1 estão apresentadas as reações catalisadas pela transglutaminase.

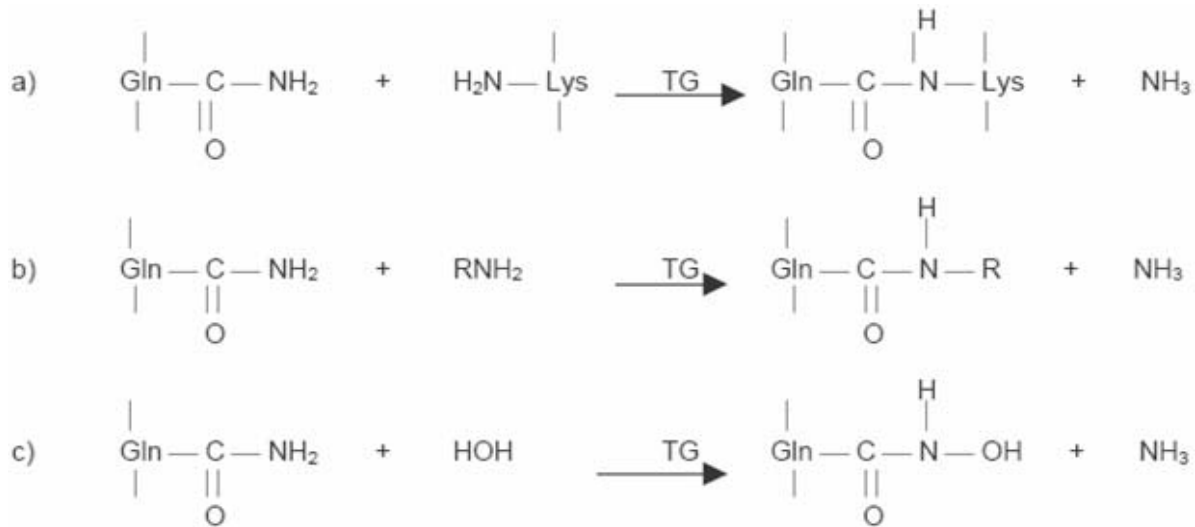


Figura 1. Reações catalisadas pela transglutaminase. (a) Formação de ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina de proteínas e peptídeos (b) incorporação de aminas (c) deaminação (adaptado de JONG e KOPPELMAN, 2002).

A transglutaminase está amplamente distribuída na natureza. Sua presença já foi confirmada em diversos tecidos animais, em peixes, plantas e microrganismos. A purificação, caracterização e aplicação da TG de origem animal, proveniente principalmente do porquinho-da-índia e dependente de íons cálcio, têm sido estudadas amplamente desde os anos 60 (FOLK e COLE, 1966).

Ando et al. (1989) produziram a transglutaminase derivada de microrganismos por processo de fermentação, visando a substituição da enzima proveniente de animais. Das diversas cepas estudadas, *Streptoverticillium* e *Streptomyces* sp., mostraram ter capacidade de produzir a transglutaminase.

A transglutaminase derivada de microrganismos apresenta uma cadeia polipeptídica simples, com massa molar de aproximadamente 38,0 kDa. Seu ponto

isoelétrico está em torno de 8,9, pH ótimo na faixa de 5,0 a 8,0 e temperatura ótima 50 °C. (MOTOKI e SEGURO, 1998)

A capacidade da TG de introduzir ligações cruzadas inter e intra polipeptídeos tem sido aplicada para aumentar o valor e as propriedades nutricionais de proteínas de alimentos (CHISTENSEN et al., 1996). Dentre as aplicações da transglutaminase, destacam-se a formação de géis, filmes, emulsões, polimerização de peptídeos e polímeros homólogos e heterólogos entre diferentes proteínas, criando funcionalidades totalmente novas (JAROS et al., 2006)

As proteínas modificadas pela TG são as provenientes da soja, soro de leite bovino, glúten e proteínas de carne (ZHU et al., 1995; MOTOKI et al., 1984; JAROS et al., 2006). A formação de ligação cruzada nas proteínas do leite pode aprimorar as propriedades tecnológicas e funcionais relacionadas à textura, formação do gel e redução da sinérese no produto final (JAROS et al., 2006). Devido à estrutura mais compacta e globular das proteínas do soro de leite, o fenômeno de ligação cruzada nestas proteínas tende a ser menos eficiente quando comparado com a caseína (SHARMA et al., 2001).

A molécula de β -Lg possui 9 resíduos de glutamina e 15 de lisina. A ligação ϵ -(γ -glutamil) lisina leva à formação de polímeros de alta massa molar. A estrutura secundária e terciária da β -Lg no seu estado nativo pode impedir a ação enzimática da TG. Desta forma, a desnaturação completa ou parcial da β -Lg pode ser necessária para facilitar a atuação desta enzima. A desnaturação pode ser induzida pelo tratamento térmico a temperaturas superiores a 70 °C ou pela adição de agentes desnaturantes tais como ditioneitol (DTT) ou β -mercaptoetanol que clivam as ligações dissulfeto (EISSA et al., 2006). Na Figura 2, observa-se o possível mecanismo de ação do DTT e sua influência na polimerização induzida pela transglutaminase.

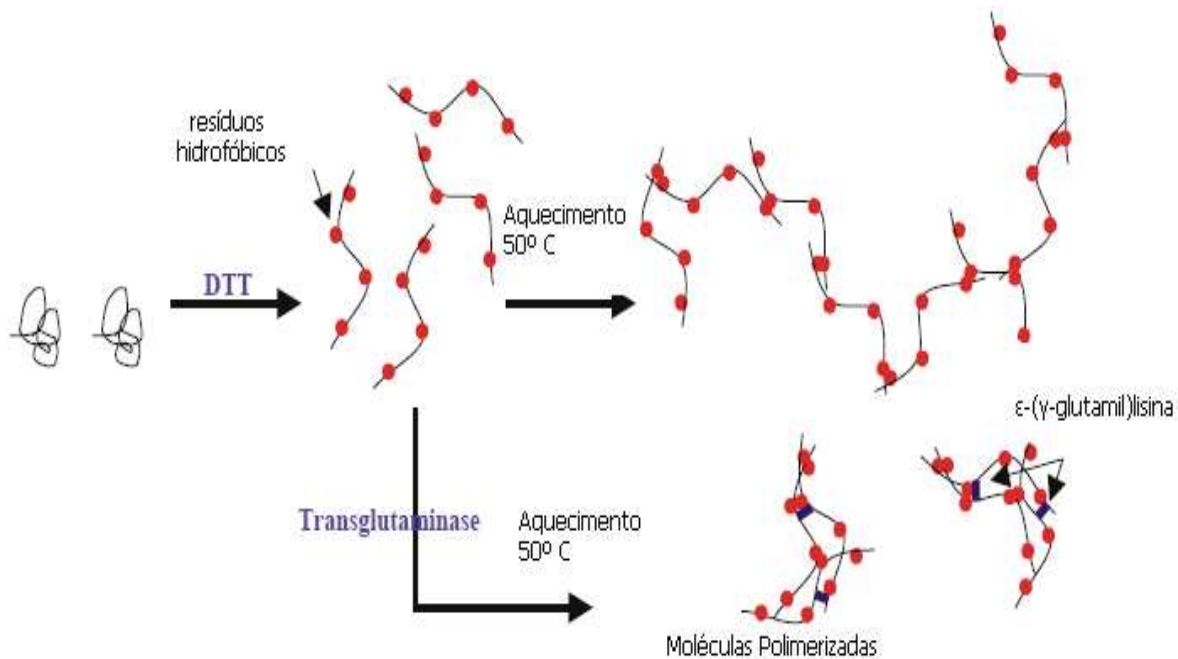


Figura 2. Possível mecanismo de ação catalisada pela transglutaminase após tratamento da proteína com agente redutor, na formação de estruturas protéicas mais compactas (adaptado de EISSA e KHAN, 2006).

Rodriguez-Nogales (2005) verificou o efeito do tratamento de pré-aquecimento do leite em diferentes condições de temperatura (17 °C – 90 °C) e tempo (15-60 min) antes da incubação com TG a 40 °C. As melhores condições de pré-tratamento para a formação de ligações cruzadas e novos polímeros a partir da α -LA e β -Lg foram a 90 °C/60 min e 83,4 °C/55,7 min, respectivamente para ambas as proteínas.

O pré-aquecimento do leite afeta a estabilidade e leva ao desdobramento e maior flexibilidade da estrutura protéica, aumentando a suscetibilidade das proteínas à reação catalisada pela TG e subsequente formação de polímeros (SHARMA et al., 2001).

A formação de ligações cruzadas na β -Lg, α_{s1} -caseína e κ -caseína, com TG (extraída de fígado de cobaias), utilizando DTT como agente redutor, foi reportada por Motoki e Nio (1983). Estes autores concluíram que a β -Lg foi um substrato

menos eficiente que a caseína: a β -Lg foi parcialmente polimerizada em 180 min enquanto as outras proteínas foram completamente polimerizadas pela TG. Tanimoto e Kinsella (1988) também observaram que a β -Lg é um substrato mais pobre que a caseína, mesmo após a utilização de DTT para aumentar a reatividade, no entanto verificaram que incubação da β -Lg (5 % p/p) por 160 min com a TG, resultou na formação de um coágulo branco, atribuído às ligações cruzadas. Cozzolino et al. (2003), ao contrário, verificaram que, entre as proteínas do leite, tanto a caseína como as proteínas do soro β -Lg e α -La são bons doadores de grupo acil e substratos receptores da TG.

A formação de ligações cruzadas nas proteínas do soro de leite também foi investigada por Aboumahmound e Savello (1990), os quais concluíram que o DTT, ao romper as ligações dissulfeto nas proteínas, aumenta a reatividade destas proteínas para formação de ligações cruzadas covalentes. Posteriormente, Traoré e Meunier (1992) verificaram que a formação de gel de β -Lg na presença de TG, Ca^{2+} e DTT não foi causada diretamente pela indução enzimática de ligações covalentes, mas estão relacionadas principalmente com interações não-covalentes e combinação do desdobramento da proteína pelo DTT e efeito do Ca^{2+} , muito similar ao reportado por Schmidt et al. (1979), que mostraram que baixas concentrações de Ca^{2+} aumentaram a firmeza do gel de proteínas do soro de leite em pH neutro, provavelmente pelas interações eletrostáticas com as cargas negativas das proteínas.

O efeito da TG microbiana, independente de Ca^{2+} , nas propriedades reológicas e formação de géis a partir do isolado protéico do soro de leite foi investigada por Eissa et al. (2004) e Eissa e Khan (2006). Os estudos mostraram que em pH 8,0 houve aumento da viscosidade, estabilidade e resistência do gel, decorrente reação de ligações cruzadas catalizadas pela enzima.

Como DTT não pode ser utilizado em alimentos, alternativas para aumentar a reatividade da β -Lg por outros mecanismos foram investigadas. Faergemand et al. (1997) verificaram que a concentração de 0,4 mol/L de Cys resultou na polimerização da β -Lg quando incubada com TG derivada de *S. lydicus*. Os

autores concluíram que a TG pode polimerizar extensivamente proteínas do soro de leite em pH mais alcalino (8,5-9,0), sendo que polimerização de isolado de proteínas do soro de leite ou da β -Lg resultou na formação de géis transparentes após algumas horas a 40 °C, indicando que a reação de ligação cruzada pela TG é um método enzimático potencial para produção géis nestas proteínas. Em estudo mais recente, Forte et al. (2007) associaram a dureza de géis derivados de plasma suíno à combinação da TG e Cys, que levou à formação ligações cruzadas ϵ -(γ -glutamil)lisina e novas ligações dissulfeto decorrentes de reações de intercâmbio tiol-dissulfeto (-SH/SS).

Em estudo sobre a alergenicidade da enzima transglutaminase derivada de *Streptovorticillium morabense*, foi verificado por análise de RAST que a enzima não apresenta potencial alergênico, sendo considerada, portanto, componente seguro na modificação e produção de alimentos (PEDERSEN et al., 2004).

A modificação da soja com TG levou ao mascaramento de determinantes antigênicos nas proteínas e redução da alergenicidade, verificada por teste de Immunoblotting e ELISA (kit comercial), que utilizou soro de pacientes alérgicos às proteínas da soja (BABIKER et al., 1998). Watanabe et al. (1994) verificaram que tanto o tratamento brando como mais severo das frações solúveis e insolúveis do trigo com enzima TG diminuíram a resposta alergênica à este produto.

Em estudo mais recente, a análise por ELISA (kit comercial) mostrou que proteínas do amendoim tratadas termicamente e polimerizadas parcialmente com transglutaminase não apresentaram diminuição da resposta imunogênica, com alta capacidade de ligação com anticorpos IgE similar ao observado nas frações não tratadas (CLARE et al., 2007).

4. Material e Métodos

4.1 Material

Utilizou-se β -Lg Bio Pure Betalactoglobulina (variantes A e B, ~ 95% de proteína) doada pela Davigo Foods International Inc. (Le Sueur, MN, EUA), enzima Transglutaminase Activa WM, doada pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda, produzida por microrganismos (Ca^{2+} independente), atividade na faixa de pH de 5,0 a 8,0; temperatura ótima de reação de 50 a 55 °C e atividade declarada de 100U/g de produto, segundo informações da indústria. O agente redutor utilizado foi aminoácido Cys (Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha).

Os reagentes utilizados foram: dodecil sulfato de sódio (SDS), tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB) (Sigma- Aldrich Chemie, Steinheim, Germany); β -mercaptoetanol (Merck, Hohenbrunn, Alemanha); tiopental sódico 2.5% (Cristália, São Paulo, SP, Brasil); tetrametilbenzidina (TMB) (BD – Biosciences San Diego, CA, EUA), Tween 20 (Merck, Darmstald, Alemanha).

Os anticorpos utilizados foram: Purified Mouse IgE antibody, Purified Rat Anti-mouse IgE monoclonal antibody (BD Biosciences San Diego, CA, EUA), Anti-Rat IgG Whole molecule, Rabbit Anti-mouse IgG, Anti-Rat IgG Whole molecule peroxidase conjugate, Anti-Rat IgG Whole molecule, Mouse IgG purified Immunoglobulin e Rabbit Anti-mouse IgG peroxidase conjugate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

Para o ensaio biológico, foram utilizados camundongos BALB/ c, adquiridos do CEMIB (Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica - UNICAMP).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Unicamp (CEEA), protocolo de número 1203-1 (Anexo 1).

A Figura 3 ilustra o fluxograma geral do experimento. A β -Lg foi tratada termicamente (β -Lg TT) antes da reação com TG. Para as amostras submetidas à ação da TG na presença de Cys, não foi realizado tratamento térmico prévio. Todo material tratado foi liofilizado previamente às análises de caracterização. As amostras foram caracterizadas por eletroforese SDS-PAGE e cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM) e, avaliadas quanto à antigenicidade da proteína, através de ensaios biológico e imunoquímicos.

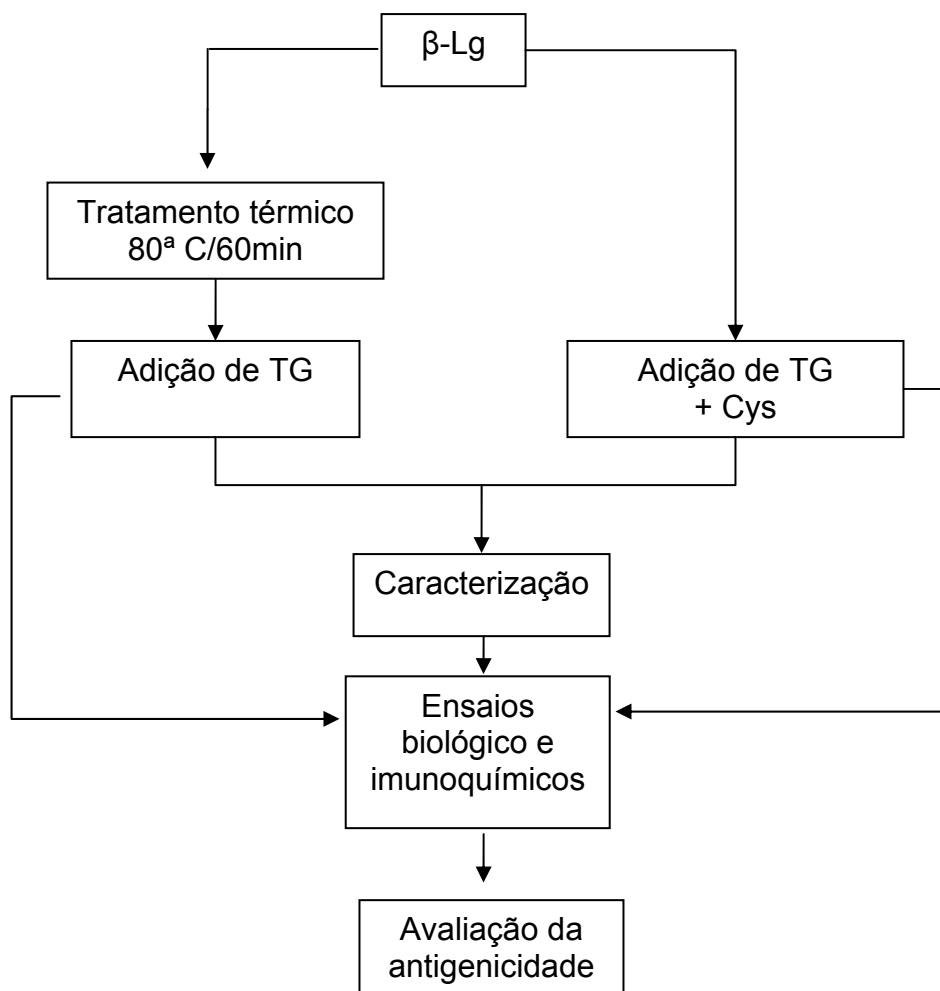


Figura 3. Fluxograma geral do experimento.

4.2. Obtenção e caracterização da β -Lg polimerizada

A polimerização da β -Lg foi avaliada em dois conjuntos de experimentos: (1) β -Lg tratada termicamente em diferentes concentrações (3, 5 e 7% p/p) a 80 °C por 60 min em banho termostatizado (EISSA et al., 2006). Após o tratamento térmico, adicionou-se a enzima TG às soluções protéicas em concentrações variando de 5 a 50U/g de proteína. (2) β -Lg tratada com enzima TG na presença agente redutor Cys nas concentrações de 0,05 a 0,4 mol/L. A reação de polimerização, nos dois experimentos, foi conduzida na condição ótima de temperatura para ação da TG, 50 °C, por 180 min em banho termostatizado (EISSA et al., 2006), e interrompida por resfriamento das amostras a 4 °C. As amostras foram liofilizadas anteriormente às análises de caracterização. A polimerização das amostras foi avaliada por SDS-PAGE e CLAE-EM.

Os produtos que apresentaram o maior grau de polimerização foram utilizados para os ensaios de *in vivo* e posterior ensaios imunoquímicos.

Nas Tabelas 1 e 2 podem ser visualizados o delineamento experimental dos experimentos realizados para estudo da polimerização da β -Lg bem como a nomenclatura utilizada para as amostras.

Tabela 1. Condições experimentais do tratamento das amostras de β -Lg com transglutaminase e nomenclatura das amostras.

Tratamento	β -Lg (%)	Relação enzima/substrato (U/g de proteína)	Nomenclatura das amostras
Tratamento térmico 80 °C + TG	3	0	3% TT
		5	3% TT 5TG
		10	3% TT10TG
		25	3% TT 25TG
		50	3% TT 50TG
	5	0	5% TT
		5	5% TT 5TG
		10	5% TT10TG
		25	5% TT 25TG
		50	5% TT 50TG
	7	0	7% TT
		5	7% TT 5TG
		10	7% TT10TG
		25	7% TT 25TG
		50	7% TT 50TG

Nota: TT= tratada termicamente, TG= enzima transglutaminase.

Tabela 2. Condições experimentais do tratamento das amostras de β -Lg com transglutaminase (25 U/g) na presença de agente redutor-Cys e nomenclatura das amostras.

Tratamento	β -Lg (%)	Cys (mol/L)	Nomenclatura das amostras
25 U TG/g de proteína + Cys	3	0,05	3% 0,05Cys TG
		0,1	3% 0,1Cys TG
		0,25	3% 0,25Cys TG
		0,4	3% 0,4Cys TG
	5	0,05	5% 0,05Cys TG
		0,1	5% 0,1Cys TG
		0,25	5% 0,25Cys TG
		0,4	5% 0,4Cys TG
	7	0,05	7% 0,05Cys TG
		0,1	7% 0,1Cys TG
		0,25	7% 0,25Cys TG
		0,4	7% 0,4Cys TG

O teor protéico total nas amostras foi determinado pelo método de micro Kjeldhal, com fator de conversão de 6,38 para a β -Lg (A.O.A.C, 1995).

4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As análises de SDS-PAGE foram realizadas como descrito por Laemmli (1970) utilizando equipamento Phast System, Pharmacia Biotech (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia) usando géis Phast-System sistema gradiente de 4 a 15% (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia). As amostras foram preparadas em tampão de amostra contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) em condições redutoras com β -mercaptoetanol 5%, e aquecidas a 96 °C/10 min para melhor solubilização do material. Os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue R250. Utilizou-se kits de marcadores peso molecular entre 14,4 a 97,4 kDa da Amersham (Upsala, Suécia).

4.4 Solubilidade

A solubilidade das amostras submetidas à reação de polimerização foi avaliada a partir do material liofilizado. As amostras (1 mg de proteína/mL) foram dispersas em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0, por agitação magnética por 20 minutos e centrifugadas a 12.000 x g/5min a 25 °C (FAERGEMAND et al., 1997). A concentração da proteína solúvel foi determinada por absorbância a 280 nm utilizando espectrofotômetro de UV-Visível, BECKMAN DU-70 (Beckman, CA, EUA), considerando-se Lei de Lambert-Beer (HALL, 1996):

$$A = E_{280}C$$

onde: A é o valor da absorbância em 280 nm; E_{280} é o coeficiente de extinção e C é a concentração de proteína. O coeficiente de extinção utilizado para os cálculos foi $E_{280} = 0,96 \text{ mL/mg} \times \text{cm}$ (EIGEL et al., 1984).

4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, consistindo de uma bomba Varian 9012,

um detector de absorvância de duplo comprimento de onda Varian 9050 e o software Star Chromatography Workstation (Varian, Walnut Creek, CA, EUA). Volume de 20 μ L de amostra na concentração 1,0 mg de proteína/mL preparada nas mesmas condições e eluente utilizados na análise de solubilidade, foi injetado em coluna RES-ELUT-SEC 2000 (300 x 7,75 mm d.i.) (Varian, Palo Alto, CA, EUA) e eluída com tampão fostato de sódio (50 mM, NaCl 0,15 M pH 6,8) a um fluxo de 0,8 mL/min, monitorada por absorção a 280 nm. A massa molar aparente correspondente aos picos eluídos foi estimada a partir de uma curva de calibração (Figura 4) construída usando marcadores da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA): tiroglobulina bovina (670 kDa), gama globulina bovina (158 kDa), ovoalbumina (44 Kda), mioglobulina (17 kDa) e vitamina B-12 (1,35 KDa).

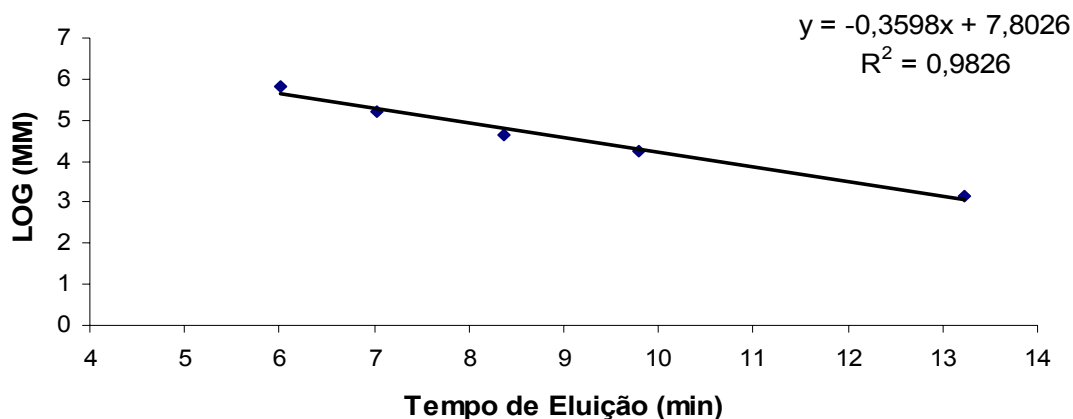


Figura 4. Curva padrão para CLAE-EM obtida com os marcadores da Bio-Rad (1,35 a 670 kDa).

4.6 Grau de polimerização nas amostras

A avaliação do grau de polimerização foi realizada segundo Faergemand et al. (1997), com modificações. A formação de polímeros (MM > 100 kDa) a partir dos resultados das análises de cromatografia CLAE-EM e eletroforese SDS-PAGE com relação a β -Lg remanescente após reação enzimática com TG foi avaliada. Para CLAE-EM, analisou-se a área relativa correspondente a cada pico no

cromatograma e para a eletroforese analisou-se o volume de área correspondente a cada banda utilizando Image Quant 400 Analysis Software versão 1.0.0 (Amersham Bioscience, Upsala, Suécia). As massas moleculares foram determinadas por comparação com os padrões de massas moleculares conhecidas e os resultados foram expressos em porcentagem.

4.7 Ensaio biológico

A Figura 5 mostra o planejamento dos experimentos biológico e imunoquímico que foram realizados com a proteína (β -Lg) com e sem modificação e com a enzima TG isoladamente.

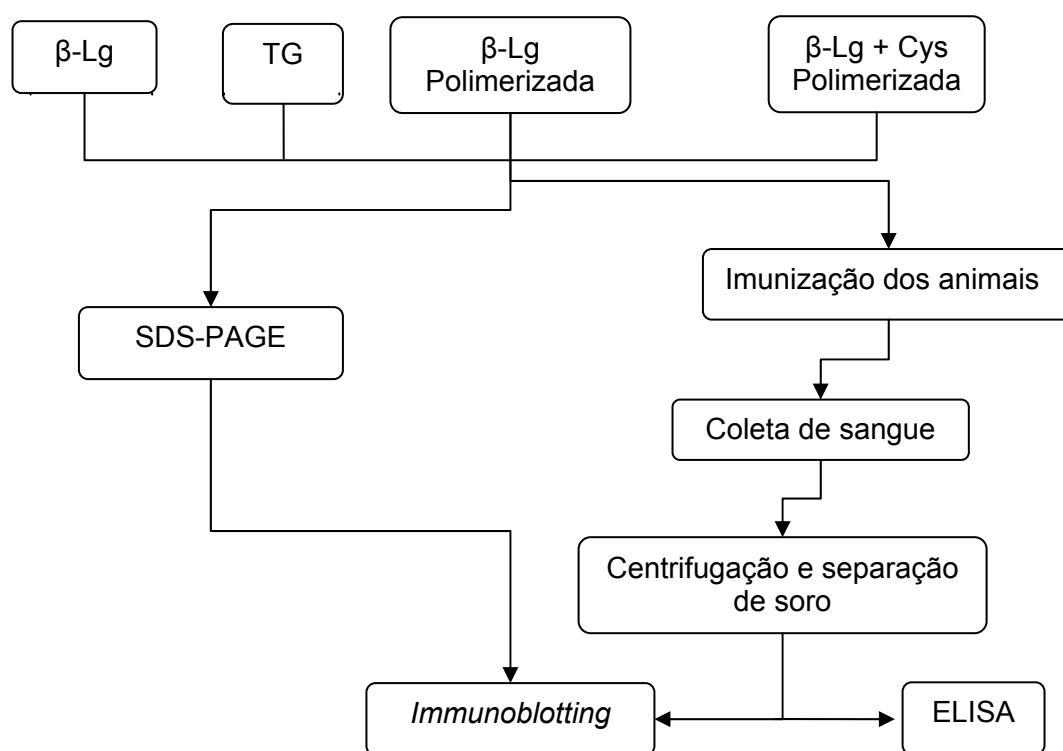


Figura 5. Fluxograma do planejamento dos ensaios biológico e imunoquímicos.

4.7.1 Animais

Foram utilizados 36 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c obtidos do CEMIB da UNICAMP, com 2 semanas de vida e mantidos em gaiolas coletivas com 6 animais cada, sob condições livre de patógenos específicos (SPF) no biotério experimental no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE) da Faculdade de Ciências Médicas – FCM/UNICAMP, com controle da umidade e temperatura, recebendo água e ração autoclavadas *ad libitum* (padrão-Nuvilab CR1), registrado no Ministério da Agricultura, PR 4453 00118, Indústria Brasileira) isenta de β -Lg.

4.7.2 Fase de sensibilização

A figura 6 mostra o protocolo experimental da etapa de imunização dos animais, realizada segundo Adel-Patient et al. (2003), com adaptações. A sensibilização inicial (primeiro dia) foi realizada em todos os animais na sexta semana de vida. Os animais, divididos em seis grupos, receberam, por via intraperitoneal (ip) e subcutânea (sc), um total de 50 μ g de amostra suspensa em solução contendo adjuvante 3% Al(OH)₃ (alúmen) . O grupo 1 recebeu β -Lg nativa, grupo 2 e 3 β -Lg nas formas polimerizadas, grupo 4 (controle) TG na forma isolada, grupo 5 (controle) solução 3% Al(OH)₃ e grupo 6 (controle) solução salina (NaCl 0,9%) estéril; com volume total de 200 μ l por animal.

No 14º e no 21º dia após a sensibilização inicial, os animais receberam, por via intraperitoneal, dose de reforço (20 μ g e 50 μ g, respectivamente) em 200 μ l de solução fisiológica estéril no 14º dia e em 3% Al(OH)₃ na segunda dose reforço.

Após 30 dias da sensibilização inicial, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 200 μ l de tiopental sódico 2.5% para realização da punção cardíaca e coleta de sangue. Depois de retirado, o sangue foi centrifugado a 1500 rpm/ 5 minutos a 20 °C para obtenção do soro.

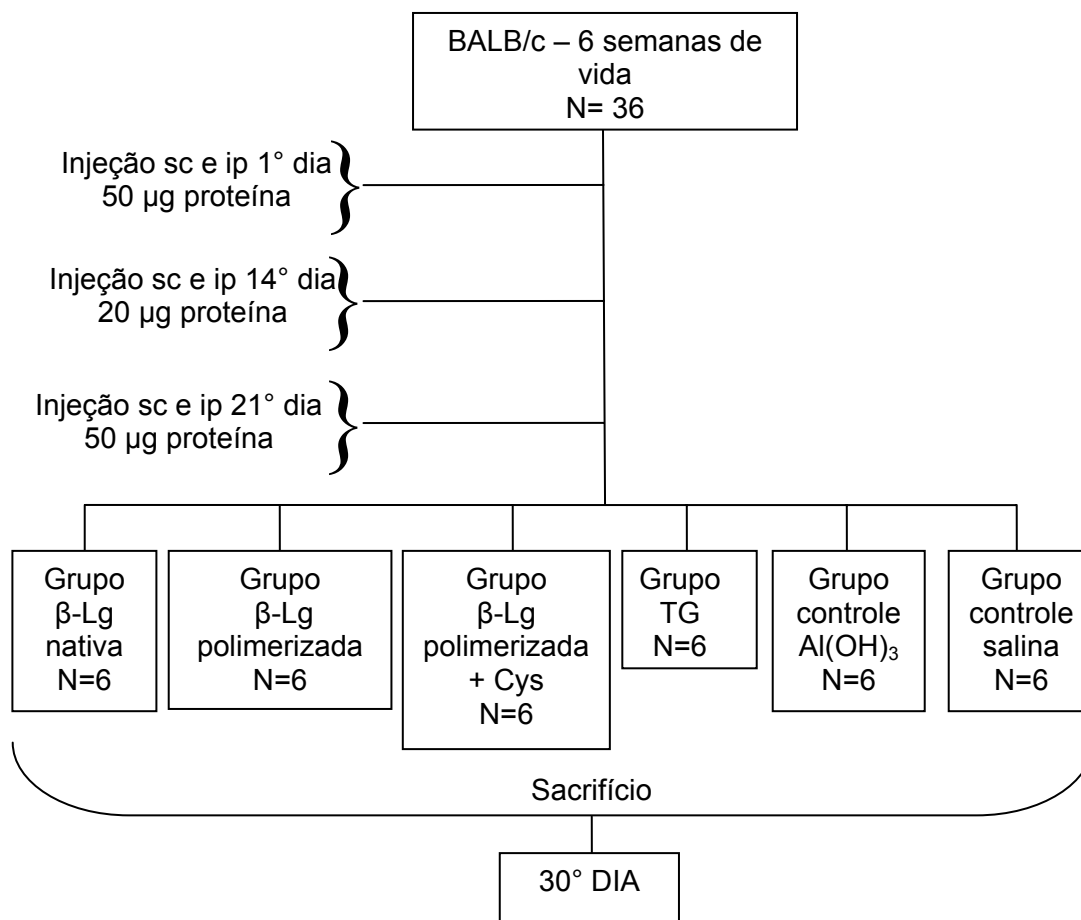


Figura 6. Fluxograma do protocolo experimental.

4.8 Ensaio Imunoquímicos

4.8.1 *Immunoblotting*

Análise de IgE e IgG

As análises de *immunoblotting* foram realizadas de acordo com Copeland (1993). As proteínas utilizadas na imunização dos animais foram separadas por eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Após término da corrida, os géis foram embebidos por 30 min em tampão de transferência (20 mM Tris-HCl, 150 mM de glicina, pH 8,0 e 20% (v/v) de metanol). Para montagem do sistema sanduíche, utilizou-se membranas de nitrocelulose e folhas de papel de filtro Whatman. A transferência das proteínas dos géis para as membranas foi a 50 mA/2h. Para

bloqueio dos sítios inespecíficos, foi utilizada solução de albumina sérica bovina - BSA (3% (p/v)) em PBS (solução salina fosfatada tamponada, pH 7,4) por 2 horas.

Para análise de IgE, as membranas foram incubadas com 10 mL de anticorpo primário (soro) correspondentes a cada grupo de animais, na proporção 1:250 em PBS por 16 horas a temperatura ambiente em agitador de plataforma (Rocker, EUA), seguida por incubação com 10 mL de anticorpo secundário na proporção 1:1.000 (Purified Rat Anti-mouse IgE) em PBS por 16 horas à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 3 vezes com solução de PBS e BSA (1% (p/v)) e então incubadas por 2 horas com anticorpo conjugado com peroxidase na proporção 1:50.000 (Anti-Rat IgG Whole molecule) em PBS, seguida por incubação de 15 min com tetrahydrocloro de diaminobenzidina) (DAB) na concentração 0,05% em PBS e solução reveladora ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + \text{NiSO}_4$) e peróxido de hidrogênio para se verificar os sítios de ligação da enzima.

Para análise de IgG, as membranas foram incubadas com 10 mL de soro na proporção 1:20.000 em PBS por 16 horas a temperatura ambiente. Foram, então, realizadas 3 lavagens com solução de PBS e BSA (1% (p/v)) e incubou-se as membranas por 2 horas com o anticorpo conjugado com peroxidase (Rabbit Anti-mouse IgG peroxidase conjugate), na proporção 1:5.000 em PBS, seguida por incubação de 15 min com DAB (0,05%) em PBS e solução reveladora ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + \text{NiSO}_4$) e peróxido de hidrogênio, para se verificar os sítios de ligação da enzima.

4.8.2 ELISA – Análise dos níveis séricos de imunoglobulinas

A análise dos níveis séricos de imunoglobulinas foi realizada segundo Brito (2006) com modificações.

Análise de IgE

Placas de polietileno contendo 96 poços foram adsorvidas com 100 μL de $\beta\text{-Lg}$ na sua forma nativa e $\beta\text{-Lg}$ nas formas polimerizadas (10 μg por poço) em

0,05M de tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e incubadas por 16 horas à 4 °C em câmara úmida.

As placas foram lavadas por 3 ciclos de 10 minutos cada, com solução 0,05% de Tween 20 em solução de salina fosfatada tamponada 0,1 M pH 7,4. Para bloqueio dos sítios inespecíficos, utilizou-se solução de soro bovino fetal 5% em PBS por 2 horas em temperatura ambiente. Após as lavagens, 100 µL das amostras de soro correspondentes a cada animal imunizado previamente diluídas (1:500) em solução de soro bovino fetal 1% e PBS foram adicionadas. Os poços destinados à realização da curva padrão foram adsorvidos com IgE (Purified Mouse IgE) com concentração inicial de 12800 ng/mL, seguida por diluições seriadas (1:2) em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M (pH 9,6) até a concentração de 25 ng/mL.

Após incubação de 16 horas, as placas foram lavadas e incubadas com 100µL de anticorpo (Anti-Rat IgG Whole molecule) – Sigma) diluído 1:250 em solução de soro bovino fetal 1% e PBS, mantidas em câmara úmida por 1 hora em temperatura ambiente. Após as lavagens, adicionou-se 100 µL de anticorpo conjugado com peroxidase (Anti-Rat IgG Whole molecule) na diluição de 1:60000 em PBS e soro bovino fetal 1%. Após incubação de 1 hora, as placas foram lavadas novamente, seguindo-se a adição de tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi bloqueada após 30 minutos, com H₂SO₄ 1N. Os valores de absorbância foram medidos a 450 nm, em espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices, Toronto, Canadá). Os cálculos foram realizados por meio de programa computacional SOFTmax PRO 3.0 (Molecular Devices).

Análise de IgG

Placas de polietileno contendo 96 poços foram adsorvidas com 100 µL de β-Lg na sua forma nativa e β-Lg nas formas polimerizadas (10 µg por poço) em 0,05 M de tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e incubadas por 16 horas à 4 °C em câmara úmida.

As placas foram lavadas por 3 ciclos de 10 minutos cada, com solução 0,05% de Tween 20 em solução salina fosfatada tamponada 0,1 M pH 7,4. Para bloqueio dos sítios inespecíficos, utilizou-se solução de soro bovino fetal 5% em PBS por 2 horas em temperatura ambiente. Após as lavagens, 100 µL das amostras de soro correspondentes a cada animal imunizado previamente diluídas (1:20.000) em solução de soro bovino fetal 1% e PBS eram adicionadas. Os poços destinados à realização da curva padrão foram adsorvidos com IgG (Mouse IgG purified Immunoglobulin), com concentração inicial de 25.600 ng/mL, seguida por diluições seriadas (1:2) em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6) até a concentração de 25 ng/mL.

Após incubação de 16 horas, as placas foram lavadas e posteriormente incubadas com 100 µL de anticorpo conjugado com peroxidase (Rabbit Anti-mouse IgG peroxidase conjugate), na diluição de 1:10.000 em PBS e soro bovino fetal 1%. Após incubação de 2 horas, as placas foram lavadas novamente seguindo-se a adição de TMB. A reação foi bloqueada após 30 minutos, com H₂SO₄ 1 N. Os valores de absorbância foram medidos a 450 nm em espectrofotômetro Spectra Max 190. Os cálculos foram realizados através do software SOFTmax PRO 3.0.

4.9 Análise Estatística

Para análise estatística utilizou-se o programa computacional InSTAT (versão 3.05, 2000). Os valores encontrados foram expressos em média com \pm desvio padrão, utilizando-se teste Kruskal-Wallis (não paramétrico – ANOVA) com post-test Dunn ou teste T-students bicaudal. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização da β -Lactoglobulina

A β -Lg apresentou $96,3 \pm 0,8\%$ de proteína. O perfil eletroforético obtido em sistema SDS-PAGE em meio redutor e o cromatográfico obtido por cromatografia líquida de exclusão molecular (CLAE-EM) da β -Lg nativa estão apresentados na Figura 7.

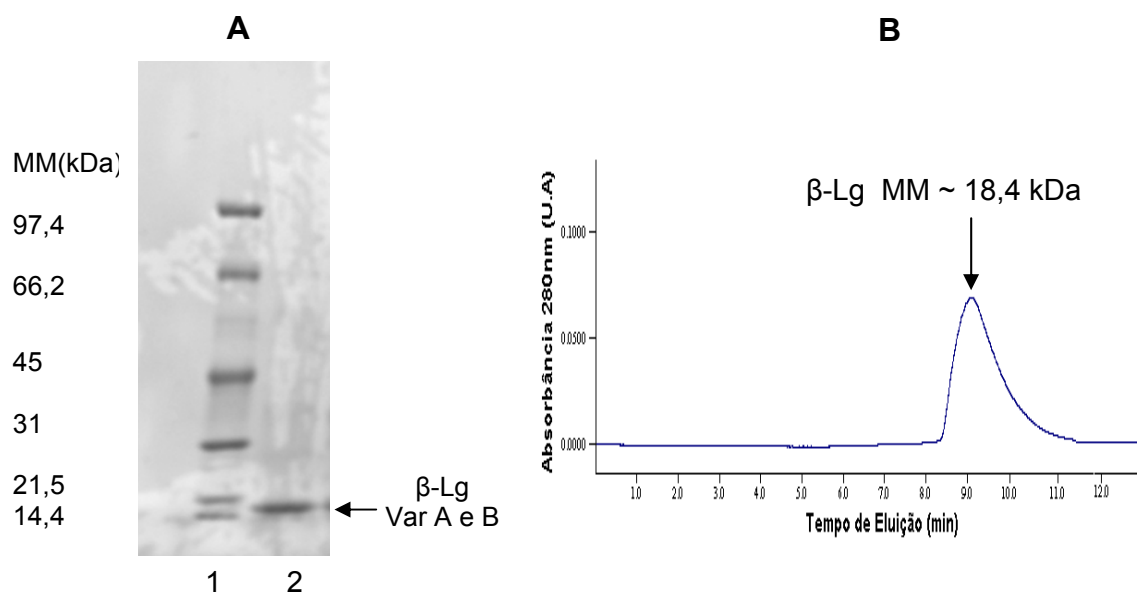


Figura 7. Perfil eletroforético da β -Lg nativa. A: SDS-PAGE, gel de poliacrilamida de 4 a 15%. Coluna 1: padrão massa molar (14,4-97,4 kDa), B: CLAE-EM (1mg/mL) em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0), fluxo de 0,8 mL/min, absorvância à 280 nm.

Na eletroforese SDS-PAGE (Figura 7A), observou-se uma única banda correspondente ao monômero da β -Lg, de massa molar $\sim 18,4$ kDa. Diversas variantes já foram identificadas no leite bovino, mas as principais são a β -Lg A e B, que apresentam diferenças nos aminoácidos na posição 64 e 118. A massa molar da variante genética A é 18,362 kDa e da variante B, 18,276 kDa (McSWEENEY, 1998), que aparecem como única banda em sistema SDS PAGE.

O perfil cromatográfico obtido por CLAE-EM (Figura 7B) mostrou apenas um pico com eluição em $\sim 9,0$ min, que corresponde à β -Lg na forma dimérica.

As análises por eletroforese e cromatografia de exclusão molecular mostraram o alto grau de pureza da β -Lg, indicada pela única banda que corresponde à forma monomérica da β -Lg em meio contendo SDS e um único pico na análise por CLAE-EM.

O perfil eletroforético da enzima transglutaminase (Figura 8) apresentou uma única banda na região de ~ 40 kDa. Resultado semelhante ao obtido por Kanaji et al. (1993) na caracterização da enzima transglutaminase comercial por SDS-PAGE e cromatografia de permeação em gel, ~ 38 kDa.

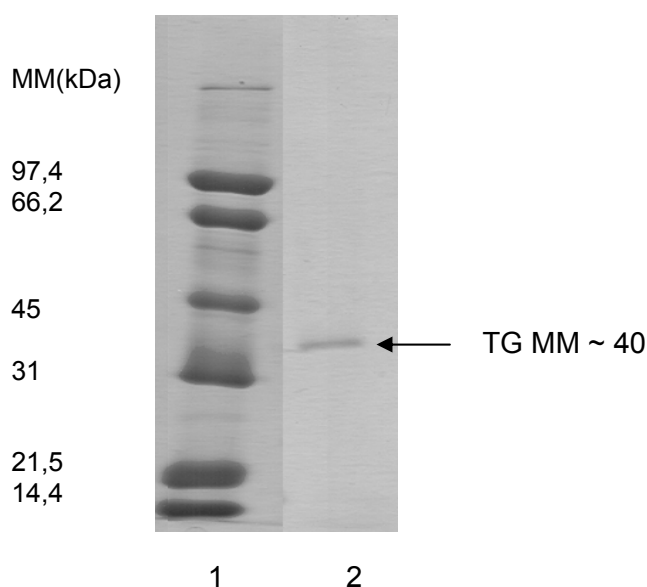


Figura 8. Perfil eletroforético da transglutaminase, em SDS-PAGE. Coluna1: padrão massa molar (14,4-97,4 kDa), coluna 2: enzima TG.

5.2 Polimerização da β -Lg

5.2.1 Influência do tratamento térmico na polimerização da β -Lg

A β -Lg foi previamente tratada termicamente (80 °C/60 min) visando à melhoria da reação de polimerização, pois no estado nativo, a β -Lg não é um bom substrato para a TG (EISSA et al., 2006). Lauber et al. (2001) reportaram melhores resultados da ação da TG quando a β -Lg e outras proteínas globulares foram previamente desnaturadas.

Na Figura 9 estão apresentados os perfis eletroforéticos da β -Lg tratada termicamente (80 °C/60 min) e polimerizada com a TG nas diferentes condições de concentração da β -Lg (3, 5 e 7%) e relação enzima/substrato (5, 10, 25 e 50 U/g de proteína). O perfil eletroforético de todas as amostras mostrou a presença de uma banda no topo do gel que não conseguiu penetrar no gel de separação, indicando que houve a formação de produtos de alta massa molar. O tratamento térmico, ao expor resíduos de lisina e glutamina das ligações peptídicas das proteínas do soro de leite aumenta a suscetibilidade para a formação de ligações cruzadas com transglutaminase (JONG e KOPPELMAN, 2002; RODRIGUEZ-NOGALES, 2006; SHARMA, et al., 2001). No tratamento térmico (80 °C/60 min) as pontes de hidrogênio que estabilizam a estrutura da β -Lg são rompidas, reduzindo a estrutura de α -hélices e folhas β (EISSA et al., 2006) e podem expor sítios ativos da proteína para a ação da TG e subsequente formação de polímeros (SHARMA et al., 2001).

A formação de polímeros de alta MM, no entanto, variou em função da concentração da β -Lg e da relação enzima/substrato utilizada no experimento. Para as amostras β -Lg 3% TT (Figura 9A), observou-se pequenas diferenças no perfil, com o aumento da concentração de TG. Mais de 50% do material detectado está na faixa de MM entre 18 e 36 kDa e, em torno de 25% do material com MM intermediária (40-100 kDa), indicando que nesta concentração de proteína, independente da concentração de TG, a polimerização foi apenas parcial.

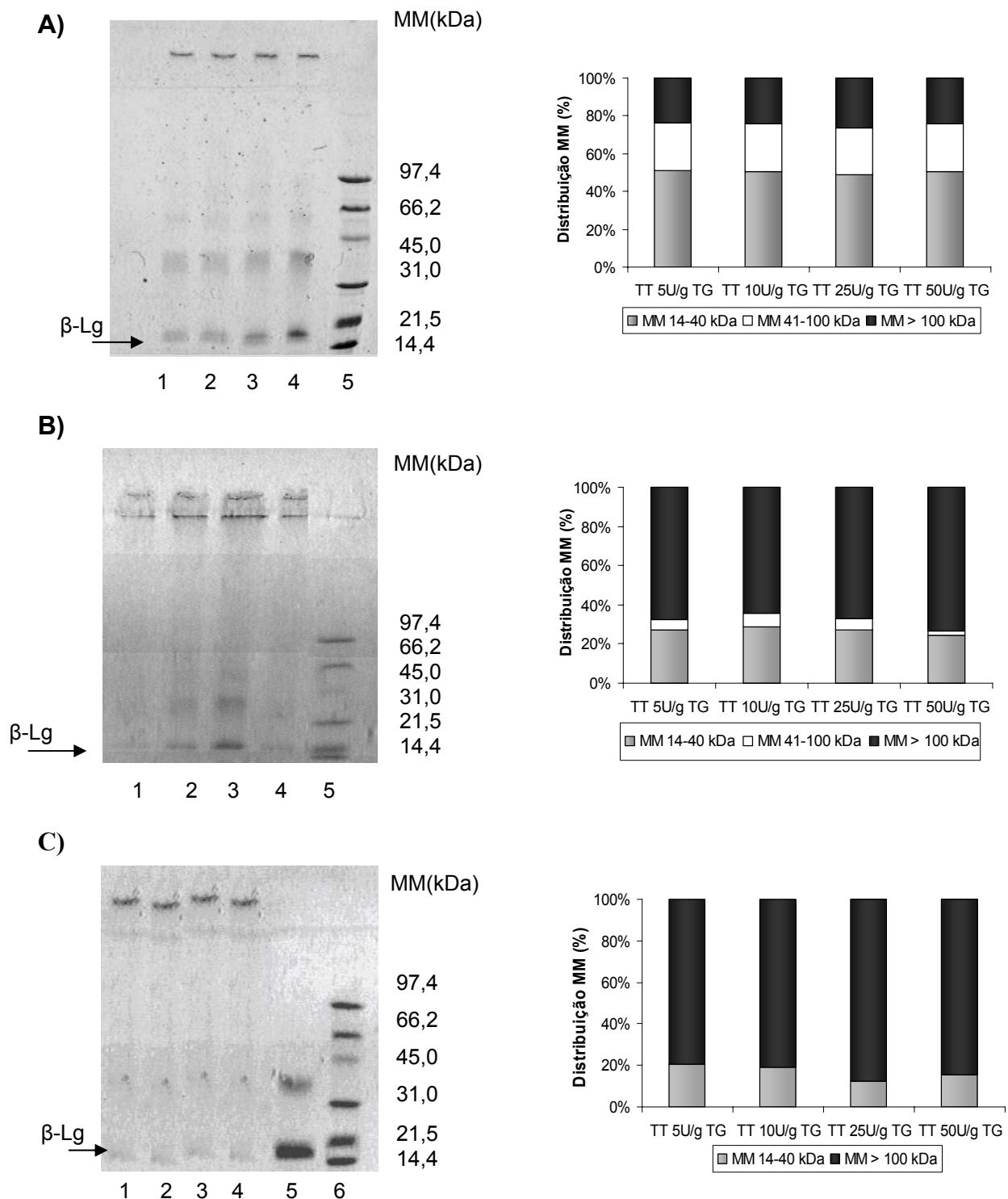


Figura 9. Perfil eletroforético (SDS-PAGE em gel de poliacrilamida com gradiente de 4 a 15%, em meio redutor). A) β-Lg 3% TT; B) β-Lg 5% TT; C) β-Lg 7% TT. Coluna 1: TG 50 U/g, coluna 2: TG 25 U/g; coluna 3: TG 10 U/g; coluna 4 TG: 5 U/g, coluna 5A, 5B e 6C: padrão massa molar (14,4-97,4 kDa). Os gráficos à direita mostram concentração relativa de produtos com massa molar de 14 a 40 kDa, 41 a 100 kDa e > 100 kDa., obtidas por densitometria.

Com 5% de β -Lg (Figura 9B), de 20% a 30% do material apresentou massa molar entre 18 e 36 kDa. Houve formação de pequena proporção (~5%) de produtos com MM intermediária (41-100 kDa) e ligeiro aumento de produtos com MM > 100 kDa, com aumento da relação enzima/substrato. Jiang et al. (2000) reportaram que a polimerização da miosina com enzima TG aumentou com o aumento da relação enzima/substrato (0,1- 0,6 U/g de proteína).

Para as amostras β -Lg 7% TT (Figura 9C), mais de 75% do material concentrou-se na região superior do gel (MM > 100 kDa) e não houve detecção de bandas correspondentes a MM de 41 a 100 kDa, como observado para as amostras polimerizadas de β -Lg 3% TT e β -Lg 5% TT.. Faergemand e Qvist (1999) verificaram que β -Lg 7% modificada pela enzima TG (10 U/g) foi extensivamente polimerizada, o que foi confirmado pelo desaparecimento quase que completo das bandas correspondente à β -Lg e pela presença de bandas predominantemente na região superior do gel, além de outras localizadas no gel de empilhamento, as quais correspondem aos polímeros de maior MM (FAERGEMAND e QVIST, 1999).

Estudo da polimerização das proteínas do isolado protéico do soro de leite (IPS) com enzima transglutaminase mostrou que maior formação de ligações cruzadas estava relacionada com o aumento tanto da concentração da enzima TG (10 U/g – 30 U/g) como da proteína (6% - 12%, p/v) (FAERGEMAND et al.,1997). No presente estudo, os resultados obtidos na análise por eletroforese também indicaram que quanto maior a concentração de substrato disponível para ação da enzima TG, maior a formação de polímeros de alta massa molar (> 100 kDa).

Na Figura 10 estão apresentados os cromatogramas das amostras de β -Lg tratadas com 10 U/g e 25 U/g de proteína. As amostras tratadas com TG 5 e 50U/g de proteína apresentaram perfil cromatográfico similares ao das amostras tratadas com 10U/g e 25U/g de proteína, respectivamente A massa molar aparente foi calculada a partir da curva padrão previamente construída com padrões entre 1,35 e 630 kDa.

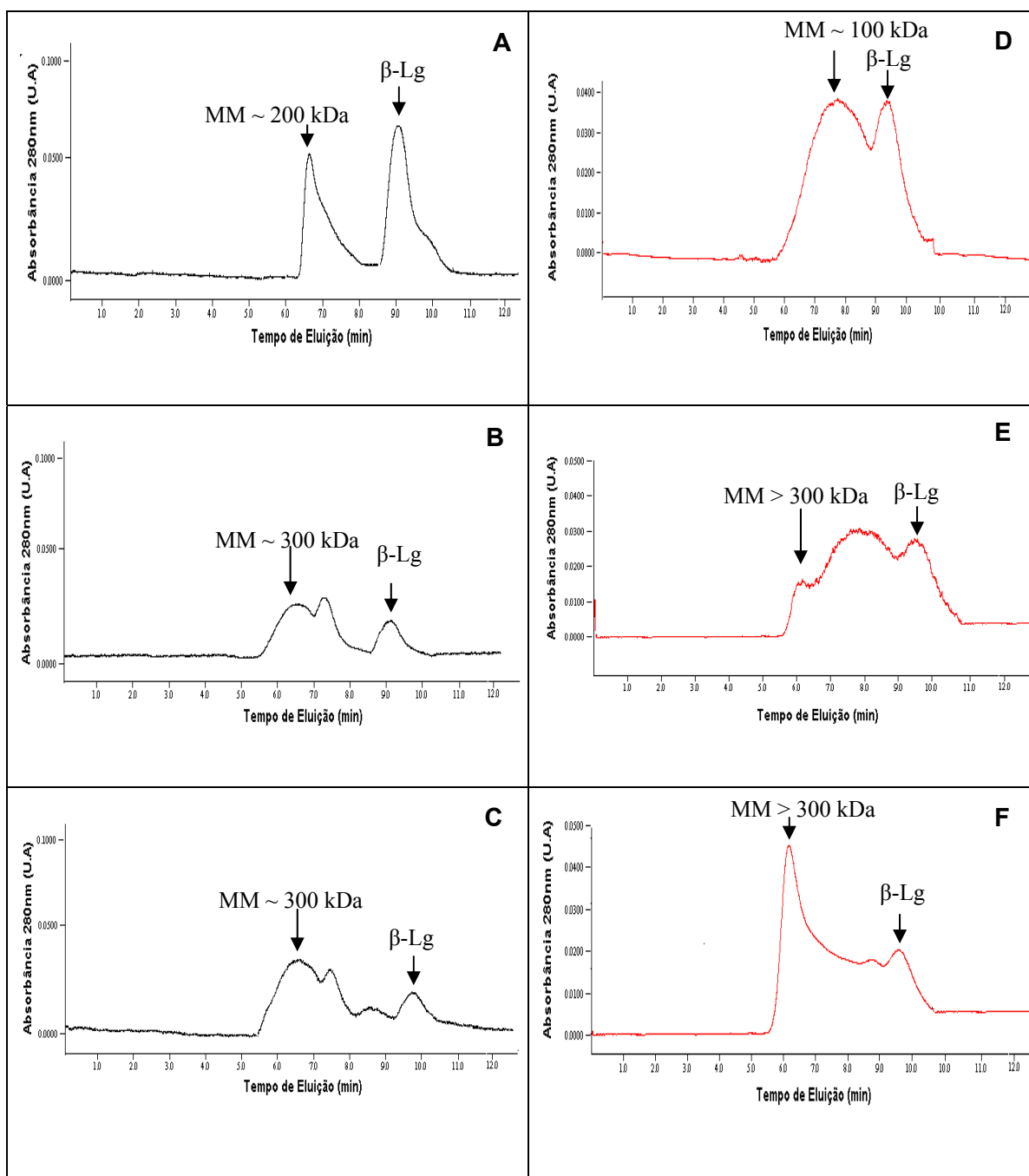


Figura 10. Perfil cromatográfico (CLAE-EM) das amostras da β -Lg (tratada termicamente a 80 °C/60 min e polimerizada com a enzima transglutaminase (50 °C, pH 8,0, 180 min). A e D: β -Lg 3%TT, B e D: β -Lg 5%TT, C e F: β -Lg 7%TT, em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0), fluxo de 0,8 mL/min, absorbância à 280 nm. A-C: amostras polimerizadas com 10U TG/g proteína; D-F amostras polimerizadas com 25U TG/g proteína.

O perfil cromatográfico das amostras polimerizadas com TG (10 U/g) (Figura 10 A-C) mostrou que houve formação de polímeros de alta MM aparente > 200 kDa. Para a amostra β -Lg 3% TT, foi detectado pico corresponde à massa molar aparente de ~ 200 kDa, enquanto que para as amostras β -Lg 5% TT e β -Lg 7% TT polimerizadas, verificou-se pico correspondente à MM massa molar aparente de ~ 300 kDa. Nos cromatogramas das amostras polimerizadas, houve indícios da presença da β -Lg na forma de dímero (tempo de eluição entre 9 - 10 min). Chuan e Ching (2007) observaram para β -Lg 5% tratada com TG 10 U/g de proteína, ampla distribuição de massa molar, porém foi reportada a presença de polímeros com massa molar estimada em aproximadamente 500 kDa, acima da encontrada no presente estudo.

Os perfis cromatográficos das amostras tratadas termicamente e polimerizadas com 25U/g de proteína estão apresentados na Figura 10 (D-F). A amostra β -Lg 3% TT 25TG apresentou pico correspondente ao dímero da β -Lg e polímeros com MM ~ 100 kDa, inferior à massa molar detectada (> 300 kDa) nas amostras β -Lg 5%TT 25TG e β -Lg 7% TT 25TG. Porém, enquanto β -Lg 7% TT 25TG apresentou um pico corresponde aos polímeros de alta massa molar, no tempo de eluição ~ 6 min, a amostra β -Lg 5% TT 25TG apresentou pico mais largo, com separação pouco definida, sugerindo formação de polímeros com distribuição de massa molar ampla entre 50 a 300 kDa. Nestas amostras também houve indícios da presença de β -Lg na forma dimérica (pico com tempo de eluição entre 9,0 e 10,0 min).

Comparando-se as amostras tratadas com 10 U/g e 25 U/g de proteína verificou-se que o aumento da concentração de enzima TG levou à formação de polímeros de maior massa molar (> 300 kDa), principalmente na β -Lg 7%TT.

Ressalta-se, no entanto, que os resultados apresentados referem apenas à fração solúvel do material no eluente utilizado. Como parte do material ficou retida na membrana de filtração, fez-se um estudo da solubilidade das amostras polimerizadas. Na Figura 11 está apresentada a solubilidade das amostras (0,1%

de proteína, p/v) em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0), mesmo eluente utilizado para análise cromatográfica CLAE-EM.

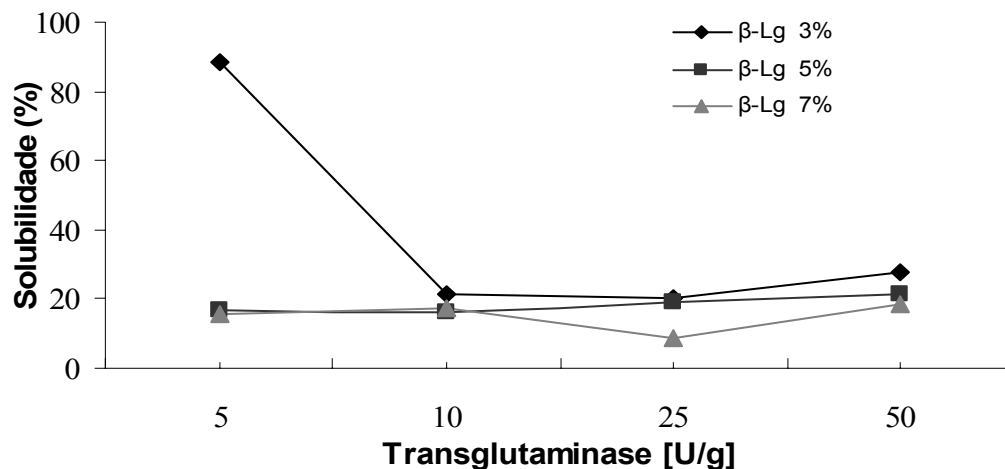


Figura 11. Solubilidade das amostras de β -Lg tratada termicamente à 80 °C e polimerizada com TG (50 °C/180 min, pH 8,0) em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0), absorvância à 280 nm.

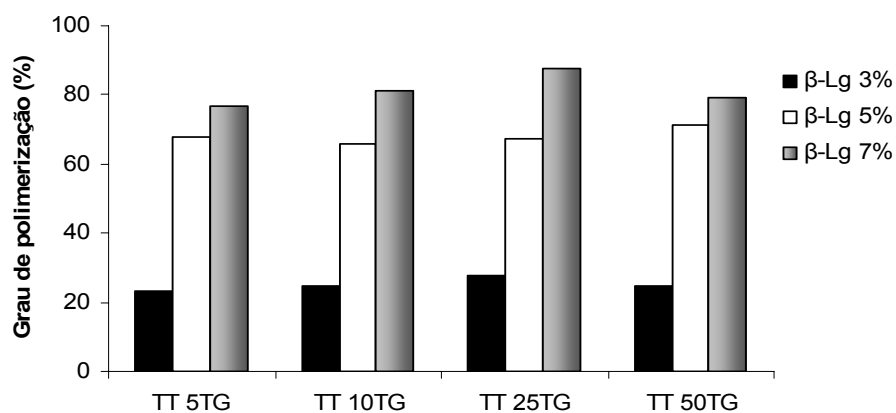
A solubilidade das amostras foi influenciada tanto pela concentração da proteína como pela relação enzima/substrato. A amostra β -Lg 3% TT 5TG foi a que apresentou a maior solubilidade, 88,3%. Para essa concentração de β -Lg, a menor solubilidade foi a da amostra tratada com TG 25 U/g de proteína (20,7%). Amostras β -Lg 5% TT apresentaram solubilidade máxima de 21,2% (β -Lg 5% TT 25TG) e mínima de 16,0% (β -Lg 5% TT 10TG). Já para amostras de β -Lg 7%TT, o valor máximo de solubilidade foi 18,8% (β -Lg 7% TT 50TG) e mínima 8,7% (amostra 7% TT 25TG). A baixa solubilidade, $\leq 20\%$ para a maioria das amostras, pode estar relacionada à formação de agregados insolúveis de massas moleculares elevadas resultantes do tratamento térmico e da ação da enzima TG, já que sem adição da enzima a solubilidade da β -Lg tratada a 80 °C por 60 min e a 50 °C por 180 min foi 80,9% e 87,6%, respectivamente.

Em estudo sobre a formação de ligações cruzadas nas principais frações do soro de leite (β -Lactoglobulina, α -Lactalbumina) submetidas ao tratamento

enzimático com TG, foi observada diminuição da solubilidade em água e aumento da viscosidade do material (JAROS et al.,2006).

O grau de polimerização das amostras foi calculado tanto a partir dos resultados da eletroforese (densitometria dos géis) como da cromatografia de exclusão molecular (área dos picos), pela relação percentual dos polímeros com $MM > 100$ kDa em relação ao total. Os resultados estão apresentados na Figura 12.

A)



B)

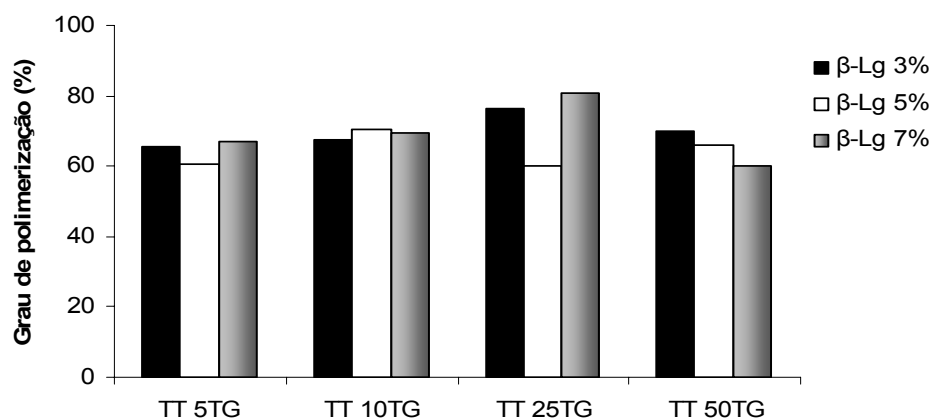


Figura 12. Grau de polimerização das amostras de β -Lg desnaturadas termicamente à 80 °C e tratadas com TG (U/g de proteína) a partir de: **A:** eletroforese SDS-PAGE e **B:** CLAE-EM. Condições de reação com TG: 50 °C/180 min, pH 8,0.

O grau de polimerização das amostras β -Lg 3% TT, calculado a partir do perfil eletroforético (Figura 12A), apresentou pequena variação, em função da relação enzima substrato (entre 23% e 28%), valores inferiores aos obtido para as amostras polimerizadas com maior concentração de proteína. Para β -Lg 5% TT, o grau de polimerização também apresentou pequena variação, 65% (β -Lg 5% TT 10TG) a 71% (β -Lg 5% TT 50TG). O maior grau de polimerização (~ 90%) foi verificado nas amostras de β -Lg 7% com 25 U/g de TG.

O menor grau de polimerização, calculado pela análise por CLAE-EM (Figura 12B), foi de 60% para β -Lg 5% TT 5TG. O tratamento das amostras com 25 U/g levou ao maior grau de polimerização, de 76% e 80% nas amostras β -Lg 3% e 7%, respectivamente. Estes valores são semelhantes aos obtidos por CLAE-EM, por Faergemand et al. (1997) que reportaram, para concentração de β -Lg 8% e 10 U/g de proteína, formação de 80 a 90% de polímeros com massa molar > 100 kDa.

Enquanto o grau de polimerização calculado a partir dos resultados de densitometria dos géis mostrou claro aumento com o aumento da concentração da β -Lg, os resultados obtidos por CLAE-EM, mostraram grau de polimerização similares, independente da concentração do substrato e da enzima. Para amostras β -Lg 3% TT, independente da relação/enzima substrato utilizada, o grau de polimerização obtido pelo perfil eletroforético foi em torno de 20%, enquanto que o obtido por CLAE-EM foi \geq 65%, para a fração solúvel no eluente. Estes resultados sugerem, que nesta concentração de proteína, o material solúvel de alta MM detectado na cromatografia pode conter moléculas de β -Lg ligadas por interações não covalentes ou covalentes do tipo dissulfeto, formadas devido ao tratamento térmico (EISSA et al., 2006) e não ϵ -(γ -glutamil)lisina, formada pela ação da TG. Na eletroforese, como as interações não covalentes e as dissulfídicas são rompidas, verificou-se que o grau de polimerização pela formação de ligações isopeptídicas foi menor nestas amostras.

Para as amostras β -Lg 5% TT e β -Lg 7% TT a diferença entre os resultados obtidos por eletroforese e cromatografia não foi tão evidente, sugerindo que os

agregados de alta MM aparente eram formados principalmente por ligações isopeptídicas.

5.2.2 Influência do agente redutor Cys na polimerização da β -Lg

Como visto anteriormente, a desnaturação completa ou parcial da β -Lg é necessária para facilitar a ação da TG. Além da desnaturação térmica, agentes redutores vêm sendo utilizados para alterar a estrutura de proteínas globulares e facilitar a ação da TG (EISSA et al., 2006). De acordo com Eissa et al. (2006), o DTT (dithiothreitol) é um dos agentes químicos mais empregados por aumentar a reatividade da β -Lg para ação da TG. Como DTT não pode ser utilizado na produção de alimentos, a cisteína (Cys) é uma alternativa para substituir o DTT como agente redutor (FAERGEMAND et al., 1997) e foi o agente utilizado no presente trabalho.

Experimentos preliminares mostraram que quando a Cys era adicionada à β -Lg tratada termicamente, havia formação de gel firme, que impedia a incorporação da enzima no material. Desta forma, neste experimento, a β -Lg não foi desnaturada previamente à reação de polimerização.

Considerando-se os melhores resultados de polimerização da β -Lg no experimento anterior, a relação enzima substrato foi fixada em 25U/g de proteína e, utilizou-se agente redutor Cys nas concentrações 0,05; 0,1; 0,25 e 0,4 mol/L, para as mesmas concentrações de β -Lg no experimento anterior, 3, 5 e 7%.

Na Figura 13 estão apresentados os perfis eletroforéticos das amostras de β -Lg tratadas com enzima TG (25 U/g de proteína) na presença de agente redutor Cys em diferentes concentrações.

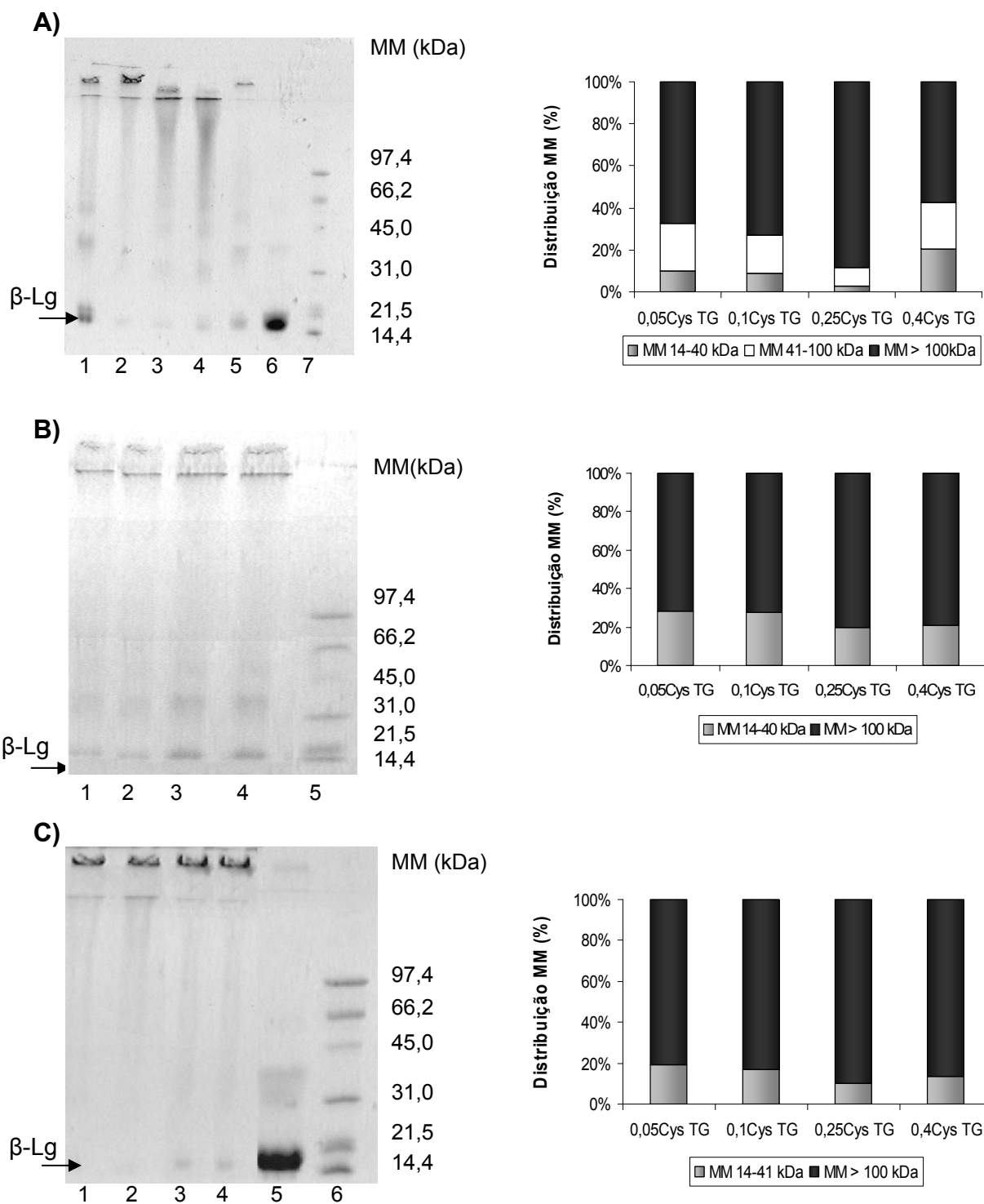


Figura 13. Perfil eletroforético SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida de gradiente 4 a 15%, em meio redutor. A: β -Lg 3%; B: β -Lg 5%; C: β -Lg 7%. Coluna 1: TG 25 U/g + Cys 0,4 mol/L; coluna 2: TG 25 U/g + Cys 0,25 M; coluna 3: TG 25 U/g + Cys 0,1 M; coluna 4: TG 25U/g + Cys 0,05 M. Coluna 5A: β -Lg 3% TG 25U; colunas 5C e 6A: β -Lg TT 50 °C; colunas 6B e 6C e 7A: padrão massa molar (14,4 - 97,4 kDa). Os gráficos à direita mostram concentração relativa de produtos com massa molar de 14 a 40 kDa, 41 a 100 kDa e, > 100 kDa., obtida por densitometria das bandas.

Para as amostras β -Lg 3% polimerizadas em todas as concentrações de Cys (Figura 13A), observou-se a presença de bandas largas e difusas, abrangendo ampla distribuição de MM (45,0 a 97,4 kDa). O percentual de β -Lg monomérica decresceu com o aumento da concentração de Cys, até 0,25 mol/L. Com 0,4 mol/L, a maior concentração de Cys utilizada, (Figura 13A, coluna 1), embora tenha sido observado maior concentração relativa de produtos de maior massa molar, observou-se também pequeno aumento da concentração relativa do monômero da β -Lg em relação ao observado nas amostras tratadas com menor concentração de Cys. Na presença de concentrações elevadas de Cys pode ocorrer diminuição na atividade da TG a qual apresenta no seu sítio ativo cisteína (Cys⁶⁴) com grupo tiol que participa de reações enzimáticas (ANDO et al., 1989; KANAJI et al., 1993). Embora o grupo sulfridril da Cys⁶⁴ esteja localizado internamente na estrutura da enzima, pode ser exposto no meio com solvente e agir com outros agentes contendo grupo SH, como a cisteína livre utilizada como agente redutor, formando pontes dissulfeto e reduzindo a reação enzimática intermediada pela TG (KASHIWAGI et al., 2002).

O perfil eletroforético das amostras β -Lg 5% tratadas com enzima TG na presença de Cys (Figura 13B) mostra que houve a prevalência (~ 75%) de produtos com MM > 100 kDa, além da presença de alguns produtos de maior massa molar que não conseguiram entrar no gel de separação. Comportamento similar foi observado nas amostras β -Lg 7%, com a formação de produtos com MM > 100 kDa discretamente mais acentuada, principalmente nas amostras tratadas com concentrações de Cys, 0,4 e 0,25 mol/L (Figura 13C, colunas 1 e 2). Nas amostras β -Lg 7%, a presença da Cys parece aumentar a formação de polímeros com massa molar > 100 kDa, em parte retidos no gel de empilhamento, concomitante ao desaparecimento quase completo dos produtos com massa molar entre 18,4 a 36,8 kDa.

No experimento anterior, no qual o tratamento térmico foi utilizado para alterar a estrutura da molécula e facilitar a ação da TG, as amostras β -Lg 3%TT (Figura 9A) apresentaram menor formação de produtos de maior massa molar,

com cerca de 40% da β -Lg permanecendo nas formas monomérica e dimérica. Na presença de Cys, observou-se percentual maior de produtos com massa molar acima de 100 kDa (Figura 13A). Já para amostras β -Lg 5% e β -Lg 7%, a ação da Cys sugere aumento na susceptibilidade da β -Lg à polimerização, com predomínio da formação de polímeros com MM > 100 kDa, com valores semelhantes aos observados para as amostras tratadas termicamente (Figura 9B e 9C).

Em relação à análise por cromatografia, as amostras tratadas com Cys nas concentrações 0,05 mol/L e 0,4 mol/L apresentaram perfis similares aos obtidos para as amostras tratadas com 0,1 mol/L e 0,25 mol/L, respectivamente. Na Figura 14 estão apresentados os cromatogramas das amostras β -Lg tratadas com cisteína 0,1M e 0,25 mol/L. A massa molar aparente foi calculada a partir da curva padrão previamente construída com padrões entre 1,35 e 630 kDa.

No perfil cromatográfico da amostra β -Lg 3% 0,1Cys TG (Figura 14A) foram detectados picos correspondente à massa molar aparente de ~ 200 kDa e presença de pico no tempo de eluição entre 9 e 10 minutos, correspondendo ao dímero da β -Lg, similar ao observado para a amostra β -Lg 5% 0,1Cys TG (Figura 14B). Já para a amostra β -Lg 7% 0,1Cys TG (Figura 14C), foi detectado pico correspondente à massa molar aparente > 400 kDa, além disso, não houve detecção do dímero da β -Lg como observado nas amostras β -Lg 3% 0,1Cys TG e β -Lg 5% 0,1Cys TG.

As amostras β -Lg 3% 0,25Cys TG e β -Lg 5% 0,25Cys TG, Figura 14D e 14E respectivamente, apresentaram polímeros de maior massa molar (> 400 kDa) que o obtido com o tratamento com 0,1 mol/L Cys; apenas a amostra β -Lg 5% apresentou β -Lg dimérica, com pico detectado aos 9,4 minutos de eluição aproximadamente.

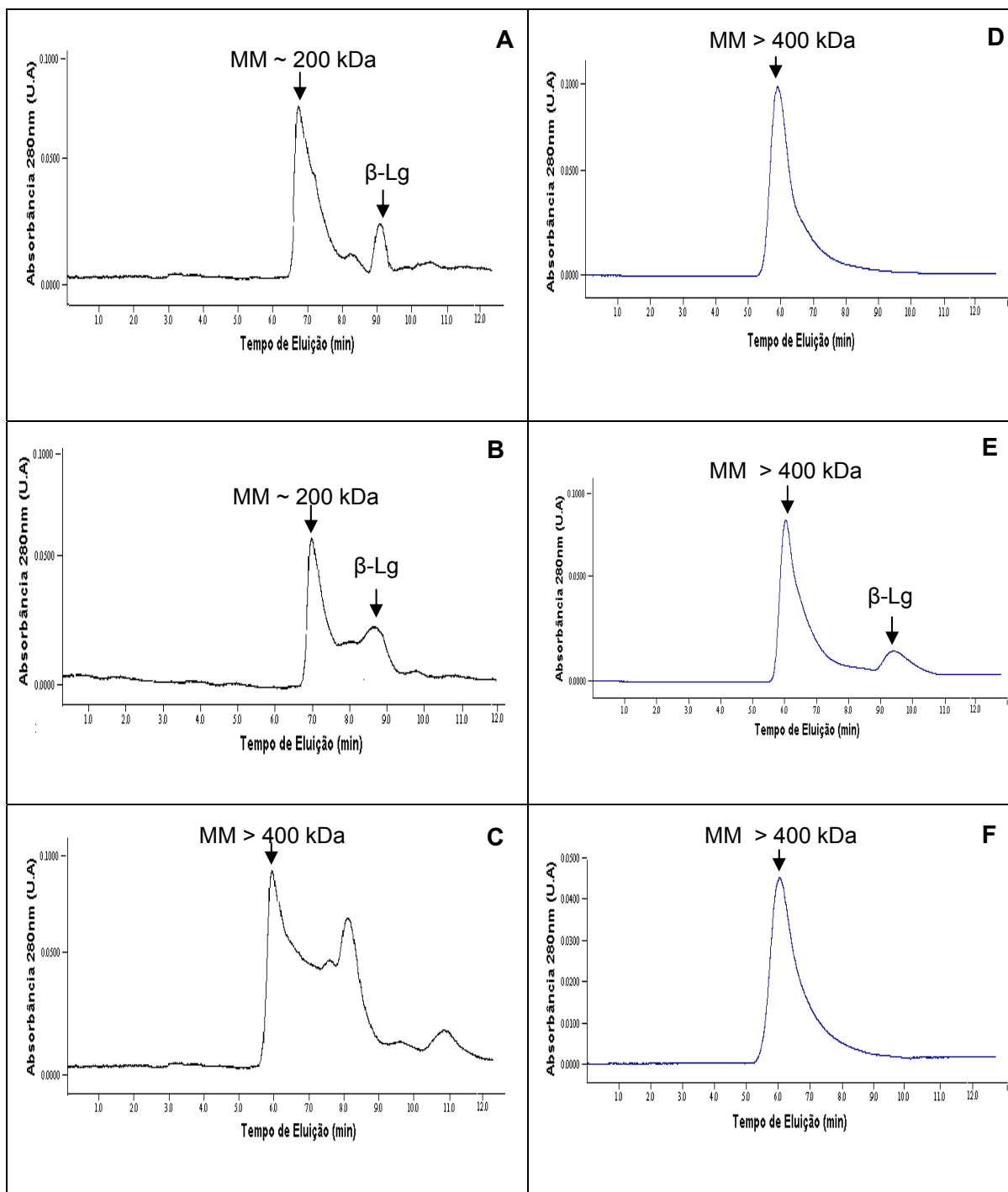


Figura 14. Perfil CLAE-EM da β -Lg, polimerizada com TG (25 U/g à 50 °C/180 min, pH 8,0) na presença de agente redutor Cys 0,1M (coluna da esquerda) e 0,25 mol/L (coluna da direita), em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0), fluxo de 0,8 mL/min, absorbância à 280 nm. A e D: β -Lg 3%, B e E: β -Lg 5%, C e F: β -Lg 7%.

Quando se compara os resultados da cromatografia dos produtos obtidos com a ação da TG na β -Lg tratadas termicamente com aquelas na presença de Cys, formação de polímeros solúveis com massa molar > 100 kDa foi mais acentuada na presença de agente redutor.

Da mesma forma que no experimento anterior, foi determinada a solubilidade das amostras tratadas com TG na presença de Cys em tampão fosfato de sódio, eluente utilizado para análise cromatográfica CLAE-EM. Os resultados estão apresentados na Figura 14.

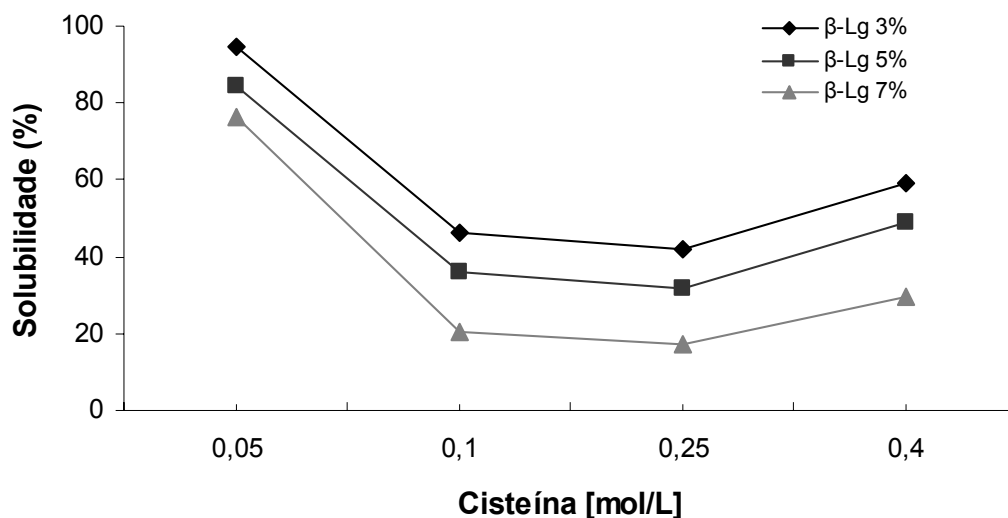


Figura 15. Solubilidade das amostras β -Lg polimerizadas com TG (25U/g à 50 °C/180 min, pH 8,0) na presença de agente redutor Cys, em tampão fosfato de sódio (10mM, pH 7,0), concentração de 1mg de proteína/mL, absorvância à 280 nm.

A solubilidade das amostras foi influenciada fortemente pela concentração do agente redutor Cys. Na concentração 0,05 mol/L, as amostras apresentaram a maior solubilidade, entre 76,4% e 94,6%. Em relação à concentração de β -Lg, produtos obtidos da reação conduzida com menor teor de proteína (3%) apresentaram solubilidade superior às demais amostras estudadas, com máximo de 94,6% e mínimo de 41,7%. As amostras polimerizadas β -Lg 5% e β -Lg 7% apresentaram perfil de solubilidade similar à β -Lg 3%, porém com valores inferiores, em todas as concentrações de cisteína estudadas.

Amostras β -Lg 5% apresentaram solubilidade máxima de 84,6% (β -Lg 5% 0,05Cys TG) e mínima de 31,7% (β -Lg 5% 0,25Cys TG). Já para amostras de β -Lg 7%, o valor máximo de solubilidade foi 76,4% (β -Lg 7% 0,05Cys TG) e mínimo de 17,1% (β -Lg 7% 0,25Cys TG).

Além da concentração de cisteína, a concentração de proteína β -Lg também influenciou a solubilidade das amostras. Quanto maior concentração de β -Lg, menor foi a solubilidade da amostra nas diferentes concentrações de cisteína estudadas o que pode estar associada à maior efetividade da ação da enzima TG, levando à formação de polímeros insolúveis de maior massa molar em função das alterações promovidas pela presença da Cys.

Os resultados do grau de polimerização calculados a partir da densitometria do gel de eletroforese e da avaliação das áreas relativas e massa molar aparente nas amostras caracterizadas por cromatografia CLAE-EM estão apresentados na Figura 16. Quando calculado a partir da eletroforese, o grau de polimerização das amostras β -Lg 5% e β -Lg 7% (Figura 16A), 65 a 90%, mostrou-se independente da concentração de Cys, apenas para a β -Lg 3% 0,4Cys TG foi menor que 60%. Comparando-se estes resultados com os obtidos para as amostras desnaturadas termicamente e tratadas com TG, verificou-se que a polimerização foi mais eficiente na presença de Cys, principalmente para as amostras de β -Lg 3% que apresentaram média de 20% de grau de polimerização (Figura 12A) e passaram à média de 80% de polimerização no tratamento com Cys.

Na análise por CLAE-EM, o grau de polimerização da fração solúvel foi acima de 70%. As amostras β -Lg 7% apresentaram maior grau de polimerização (entre 90 e 100%) que as amostras β -Lg 3% (entre 75,6 e 94,1%) e β -Lg 5% (entre 70,7 e 73,5%), para todas as concentrações de Cys utilizadas. Quando tratadas termicamente, o grau de polimerização, 69,9%, 64,2% e 69,3%, em média, para as amostras β -Lg 3%, 5% e 7%, respectivamente, foi inferior ao obtido quando a cisteína foi utilizada.

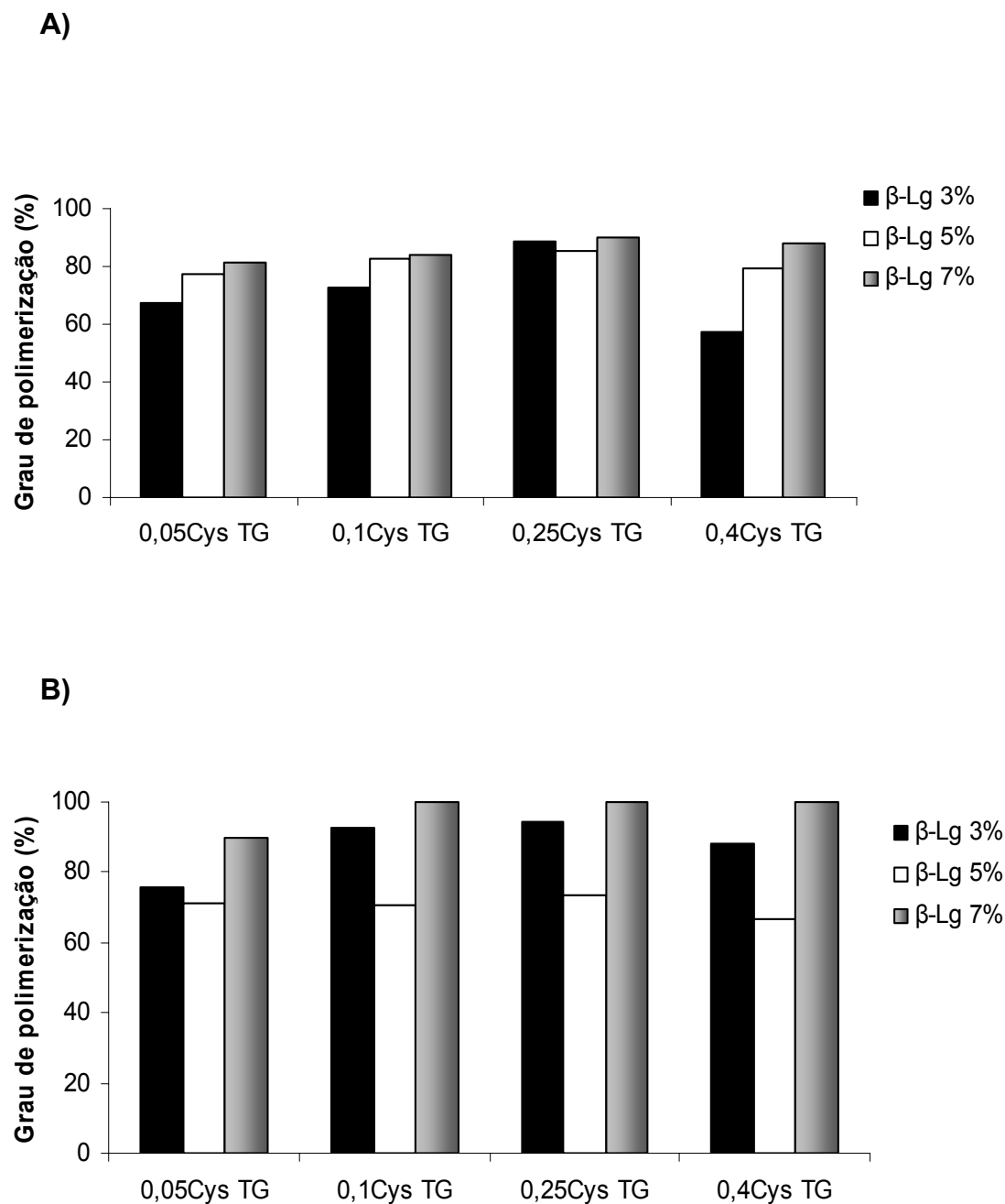


Figura 16. Avaliação da formação de polímeros (MM > 100 kDa) nas amostras β -Lg tratadas com TG (25 U/g à 50 °C/180 min, pH 8,0) na presença de agente redutor Cys (mol/L) a partir de análise A: eletroforese SDS-PAGE e B: CLAE-EM.

Os resultados obtidos indicam que a reação de polimerização pela TG pode ser melhorada com presença da Cys, que parece favorecer a formação de polímeros com MM > 100 kDa, nas condições estudadas.

Eissa et al. (2006) reportaram que a desnaturação por agente redutor, no caso o DTT, altera a estrutura da β -Lg ao clivar as duas pontes dissulfeto presentes na molécula nativa: (Cys⁶⁶ – Cys¹⁶⁰) que liga o arco C – D à região carboxi-terminal e, (Cys¹⁰⁶ – Cys¹¹⁹) que liga os filamentos G – H na molécula, facilitando a ação da enzima TG para formação de polímeros. A clivagem da ponte dissulfeto (Cys⁶⁶ – Cys¹⁶⁰) desconecta o arco C – D da região carboxi-terminal da β -Lg, abrindo a estrutura globular da proteína e, se espera que o arco C – D participe de outros rearranjos de folhas β . Além disso, a clivagem da Cys¹⁰⁶ – Cys¹¹⁹ pode também enfraquecer o contato entre as regiões G – D da molécula. Na desnaturação da β -Lg pelo DTT, observada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ocorre redução da estrutura de α -hélice, facilitando a reação de ligação cruzada nesta proteína (EISSA et al., 2006).

Faergemand et al. (1997) verificaram por cromatografia de exclusão molecular que o tratamento da α -Lactalbumina e da β -Lactoglobulina com DTT na concentração de 0,2 mol/L e enzima TG (10 a 30 U/g) otimizou a ação da TG para ambas as proteínas, alcançando 100% de polimerização para α -Lactalbumina e ~ 80% para β –Lactoglobulina quando utilizado TG 30 U/g de proteína. Fort et al. (2007) verificaram que agentes redutores como bissulfito de sódio, ácido ascórbico, glutathione e cisteína foram efetivos para aumentar a ação de enzimas como a TG em proteínas globulares como as do plasma, levando à formação de polímeros de alta massa molar com ligações cruzadas covalentes, sendo portanto considerados alternativas viáveis ao DTT para indústria de alimentos.

Tendo em vista os resultados obtidos no estudo de caracterização das amostras tratadas com TG com ou sem Cys, foram selecionadas duas amostras nas quais se obteve melhores resultados. Em relação à concentração de β -Lg, a 7% houve formação de polímeros de maior massa molar comparada às amostras

contendo 3% e 5% de proteína, principalmente no tratamento com TG 25 U/g de proteína. Quando se utilizou agente redutor Cys, observou-se que 0,25 mol/L foi a concentração que contribuiu para melhor ação da TG (25 U/g de proteína). Com isto, para seguimento do estudo relacionado à avaliação da antigenicidade, as amostras selecionadas foram β -Lg 7% TT 25TG e β -Lg 7% 0,25Cys TG.

5.3 Avaliação da Antigenicidade

As amostras utilizadas para avaliação da antigenicidade foram: β -Lg nativa, β -Lg 7% TT 25TG, β -Lg 7% 0,25Cys TG e a enzima TG. Para simplificação da nomenclatura, as amostras β -Lg nativa, β -Lg 7% TT 25TG e β -Lg 7% 0,25Cys TG, foram denominadas β Lg-n, β Lg TT TG e β Lg Cys TG, respectivamente.

As amostras foram injetadas nos animais por via intraperitoneal e subcutânea e o soro dos animais imunizados foi utilizado nas análises de identificação e quantificação da produção de anticorpos IgE e IgG para estas amostras.

5.3.1 *Immunoblotting* - Reatividade IgE e IgG

Os resultados da análise por *Immunoblotting* com os soros dos animais imunizados estão apresentados nas Figuras 17 e 18. As respostas foram avaliadas em relação à produção de IgE (Figura 17) e IgG (Figura 18) frente às amostras β Lg-n, β Lg TT TG, β Lg Cys TG e a enzima TG,. Os animais sensibilizados com solução salina NaCl 0,9%, AlOH₃ 3% e TG foram utilizados como controle (CT).

Os resultados foram analisados qualitativamente, avaliando-se a intensidade das bandas na membrana de nitrocelulose.

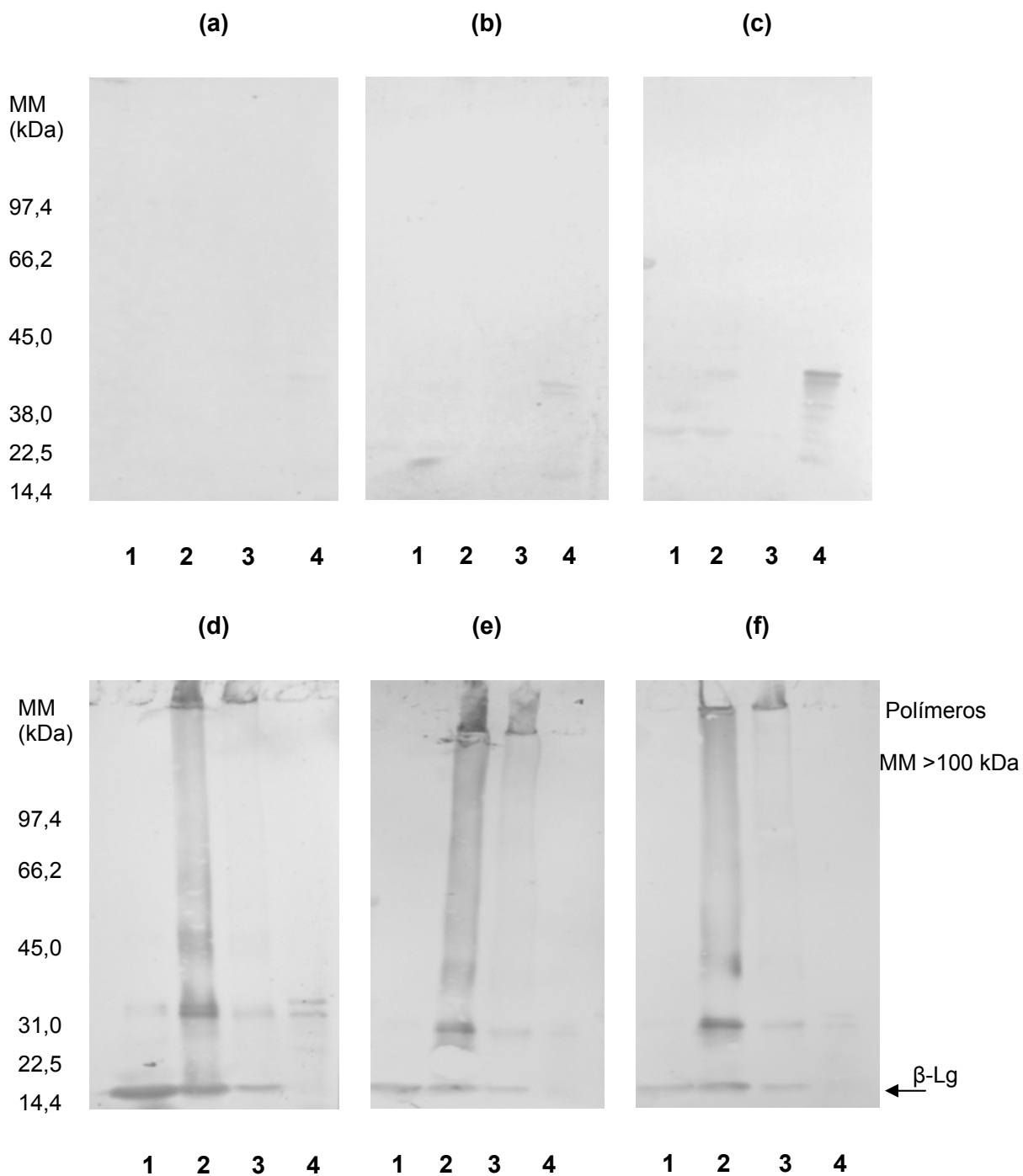


Figura 17. Análise de IgE nos soros dos animais imunizados com (a): CT salina; (b):CT alúmen; (c): CT TG; (d): βLg-n; (e): βLg TT TG; (f):βLg Cys TG , avaliados contra: βLg-n (coluna 1); β-Lg TT TG (coluna 2); β-Lg Cys TG (coluna 3); TG (coluna 4).

Em relação à análise de IgE (Figura 17), os animais sensibilizados com salina não apresentaram resposta frente às demais amostras testadas, enquanto os animais sensibilizados com alúmen apresentaram leve resposta apenas para as amostras β Lg-n e TG. Os animais imunizados com TG apresentaram resposta moderada contra a própria enzima TG e leve para as amostras β Lg-n e β -Lg TT TG.

Os grupos de animais imunizados com as proteínas teste apresentaram respostas mais acentuadas frente às amostras do que as dos grupos controle. A resposta do grupo imunizado com β Lg-n foi intensa contra β Lg-n e β Lg TT TG e moderada contra β Lg Cys TG e enzima TG. Animais imunizados com β Lg TT TG apresentaram resposta mais acentuada contra o próprio imunógeno e resposta moderada frente às amostras β Lg-n e β Lg Cys TG, enquanto os animais imunizados com β Lg Cys TG apresentaram resposta leve a moderada contra β -Lg nativa e β -Lg Cys TG e mais acentuada contra β Lg TT TG.

Em relação à análise de IgG (Figura 18), a resposta dos animais dos grupos controles foi muito menos intensa que a dos grupos de animais imunizados com as proteínas em estudo. Os animais sensibilizados com salina não apresentaram resposta contra as proteínas analisadas, enquanto para os imunizados com TG, a resposta foi moderada contra a própria enzima TG e leve para as amostras β Lg-n e β Lg TT TG.

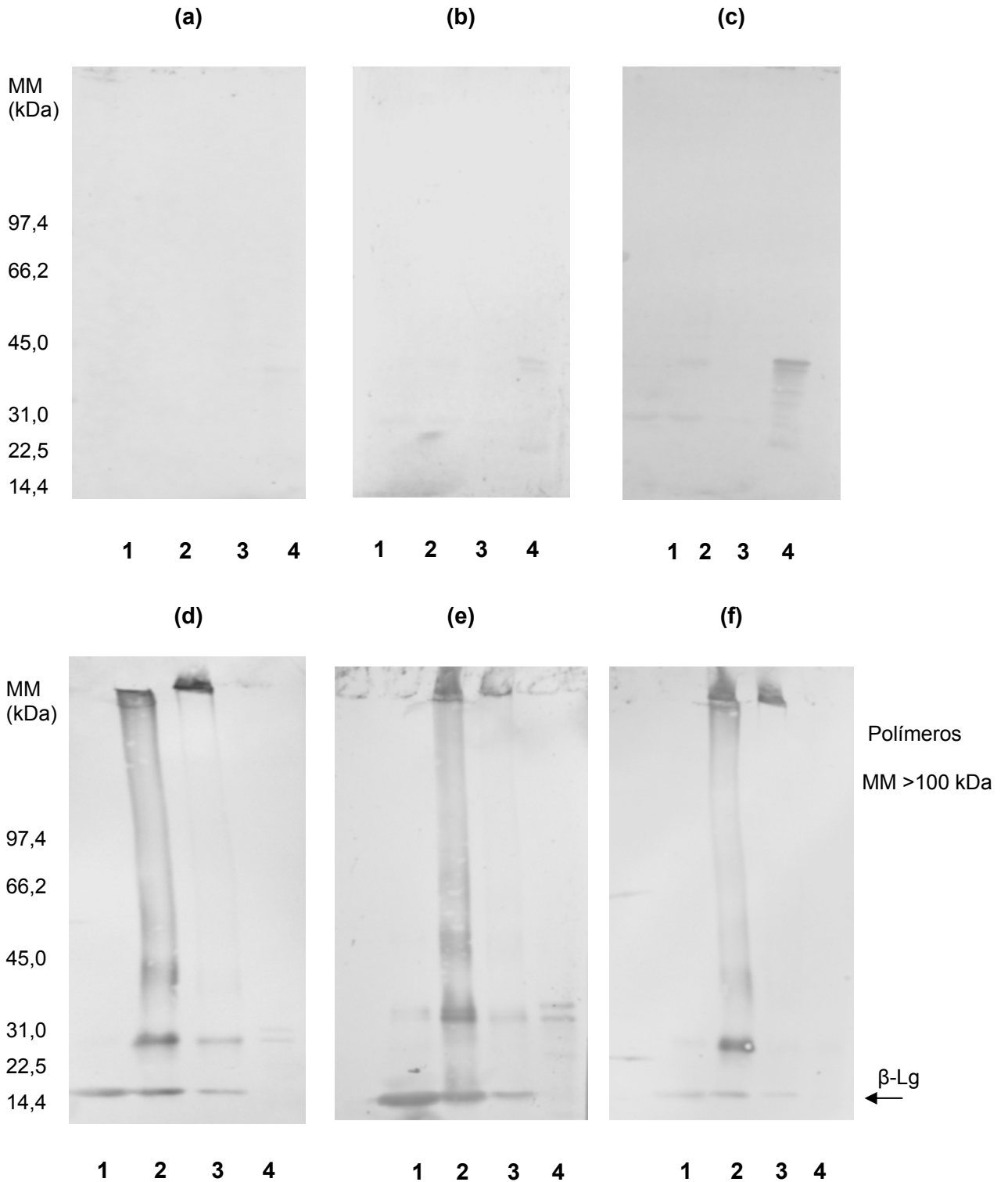


Figura 18. Análise de IgG nos soros dos animais imunizados com (a): CT salina; (b): CT alumínio; (c): CT TG; (d): βLg-n; (e): βLg TT TG; (f): βLg Cys TG, avaliados contra: βLg-n (coluna 1); βLg TT TG (coluna 2); βLg Cys TG (coluna 3); TG (coluna 4).

O grupo imunizado com β Lg-n apresentou resposta acentuada contra β Lg-n e β Lg TT TG e de leve a moderada contra β Lg Cys TG. Animais imunizados com β Lg TT TG tiveram resposta mais intensa contra a β Lg-n e a β Lg TT TG, e moderada para β Lg Cys TG e enzima TG. Já o grupo imunizado com β Lg Cys TG apresentou resposta mais intensa contra β Lg TT TG e leve a moderada frente às outras amostras.

Os resultados obtidos não mostraram claramente a diferença nas respostas de IgE e IgG dos animais frente às amostras testadas. Houve indícios, porém, de que a β -Lg induziu reatividade de moderada a alta das imunoglobulinas IgE e IgG, mesmo após polimerização com a TG, maior com tratamento térmico prévio à ação de enzima e menor quando a Cys foi utilizada.

Tendo em vista os resultados obtidos por *Immunoblotting*, foi feita complementação desta análise. Avaliou-se quantitativamente os níveis séricos de IgE e IgG nos animais imunizados, utilizando-se teste ELISA. Com esse teste, é possível estimar a concentração do complexo antígeno-anticorpo com base em uma curva padrão gerada com quantidades conhecidas de anticorpo purificado (POMS, KLEIN, ANKLAM; 2004; KOPPELMAN, HEFLE, 2006; MONACI et al., 2006).

5.3.2 ELISA - Análise dos níveis séricos de IgE

A Tabela 3 apresenta os níveis séricos dos grupos de animais utilizados como controles no presente estudo: imunizados com solução salina (NaCl 0,9%), solução alúmen (AlOH₃ 3%) e enzima TG. Os níveis séricos de IgE nestes grupos foram significativamente menores que os dos grupos de animais imunizados com a proteínas nativa e modificadas, atingindo máximo de 9,56 μ g/mL nos animais imunizados com enzima TG em resposta à amostra polimerizada com TG na presença de Cys e mínimo de 0,49 μ g/mL nos animais imunizados apenas com solução salina em resposta à amostra tratada termicamente e polimerizada com TG ($p < 0,05$).

O adjuvante alúmen, utilizado em combinação com o antígeno, tem a característica de estimulação de resposta imune humoral e produção de IgE, definida como parte do perfil de linfócitos T auxiliar 2 (Th2), por meio da formação de depósito no local da administração com elevação dos níveis de anticorpos no período de 2 a 3 semanas. O mecanismo responsável pela adsorção do antígeno ao adjuvante tem sido explicado pelas forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas, entre outras (LINDBLAD, 2004).

Tabela 3. Níveis séricos de IgE específica nos animais dos grupos controles imunizados com enzima TG, alúmen e salina.

Material utilizado na imunização	Amostra avaliada	Níveis séricos IgE ($\mu\text{g/mL}$) nos animais
enzima TG	$\beta\text{Lg-n}$	$2,42 \pm 0,05$
	$\beta\text{Lg TT TG}$	$1,59 \pm 0,10$
	$\beta\text{Lg Cys TG}$	$9,56 \pm 0,78$
Alúmen	$\beta\text{Lg-n}$	$1,76 \pm 0,10$
	$\beta\text{Lg TT TG}$	$0,53 \pm 0,11$
	$\beta\text{Lg Cys TG}$	$2,22 \pm 1,15$
Salina	$\beta\text{Lg-n}$	$1,62 \pm 0,10$
	$\beta\text{Lg TT TG}$	$0,49 \pm 0,05$
	$\beta\text{Lg Cys TG}$	$1,16 \pm 0,33$

A Figura 19 mostra os gráficos representativos da produção de IgE específica para cada amostra analisada .

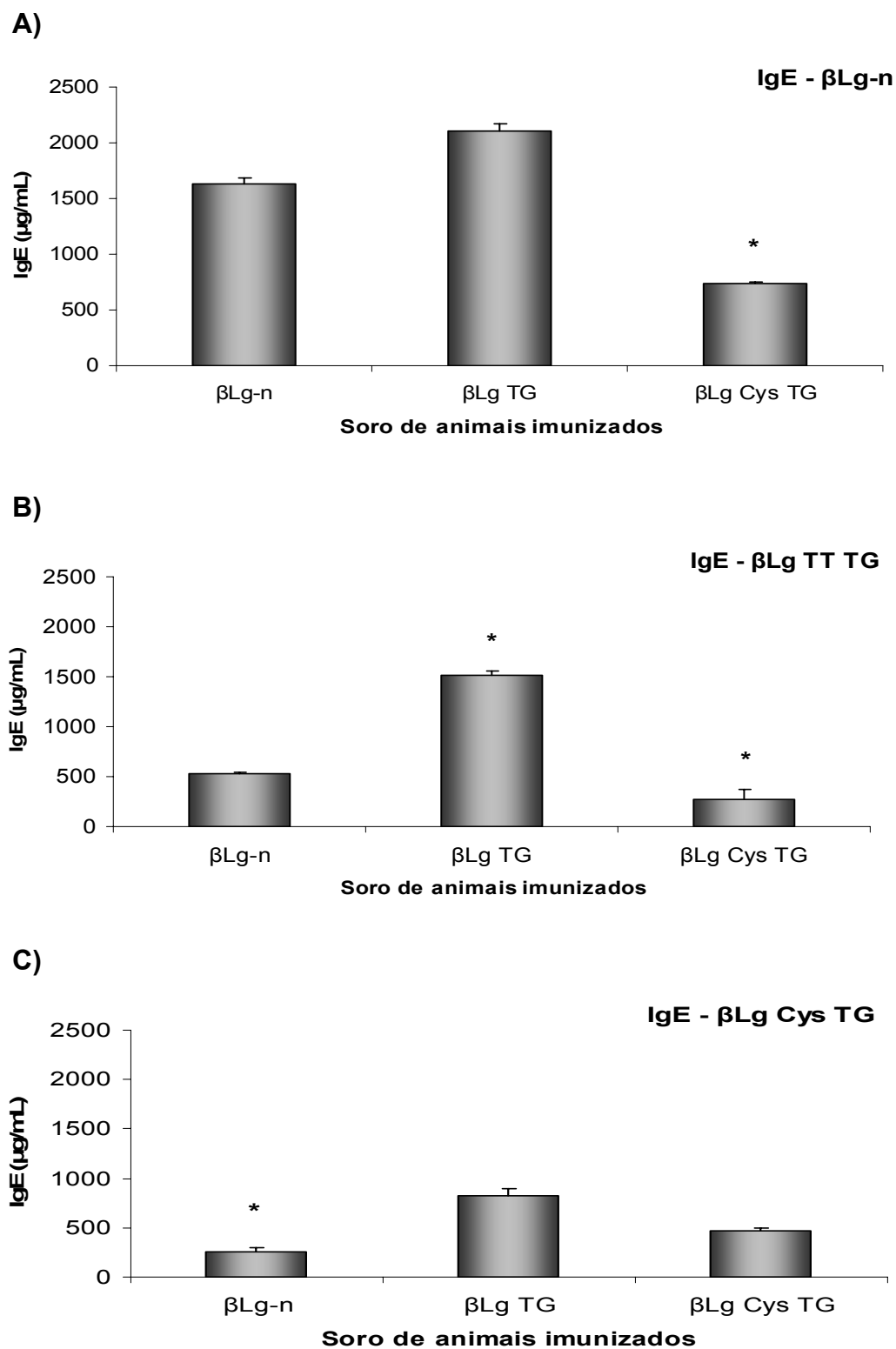


Figura 19. Níveis séricos de IgE no soro de animais imunizados com a proteína nativa (β Lg-n), tratada termicamente e polimerizada com TG (β Lg TG) e polimerizada na presença de Cys (β Lg Cys TG) avaliados contra (A): β Lg-n, (B): β Lg TG, (C): β Lg Cys TG. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Os níveis séricos de IgE contra β Lg-n (Figura 19A) apresentaram-se significativamente menores ($p < 0,05$) nos grupos de animais imunizados com β Lg Cys TG (734,7 $\mu\text{g/mL}$) que nos grupos imunizados com β Lg-n (1630,2 $\mu\text{g/mL}$) e β Lg TT TG (2111,2 $\mu\text{g/mL}$). Contra β Lg TT TG (Figura 19 B), verificou-se maiores concentrações de IgE no grupo imunizado com β Lg TT TG (1510,5 $\mu\text{g/mL}$) com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos grupos imunizados com β Lg-n (534,7 $\mu\text{g/mL}$) e β Lg Cys TG (269,3 $\mu\text{g/mL}$). Já para amostra β Lg Cys TG (Figura 19C), níveis séricos significativamente reduzidos de IgE ($p < 0,05$) foram observados no grupo imunizado com β Lg-n (257,2 $\mu\text{g/mL}$) quando comparados aos grupos imunizados com β Lg Cys TG (469,1 $\mu\text{g/mL}$) e β Lg TT TG (828,4 $\mu\text{g/mL}$). O grupo imunizado com β Lg TT TG apresentou respostas significativamente aumentadas contra todas as proteínas avaliadas comparado aos grupos imunizados com β Lg-n e β Lg Cys TG.

Entretanto, avaliando-se apenas os níveis séricos de IgE específicas de cada grupo de animais frente à proteína utilizada na imunização (Figura 20), verificou-se que os grupos que apresentaram respostas mais acentuadas foram os animais imunizados com β Lg-n (1630,3 $\mu\text{g/mL}$) e β Lg TT TG (1510,5 $\mu\text{g/mL}$). Valores significativamente menores (734,7 $\mu\text{g/mL}$) foram encontrados no grupo imunizado com β Lg Cys TG ($p < 0,05$).

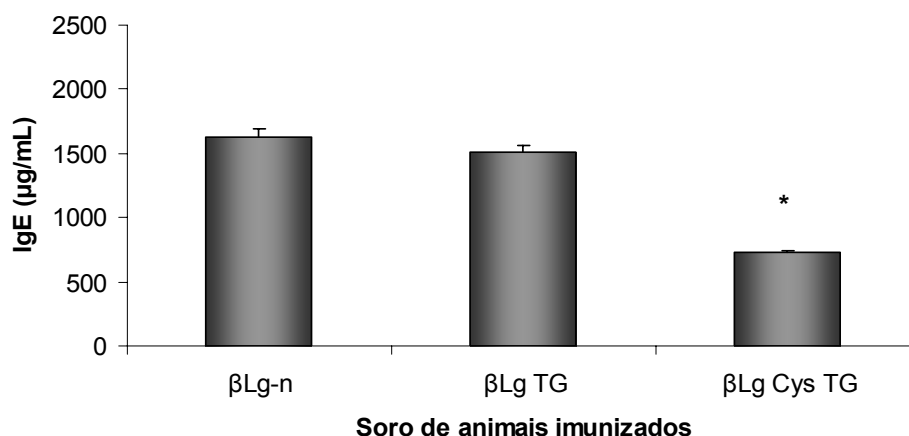


Figura 20. Gráfico representativo da produção de IgE específica frente à proteína utilizada na imunização de cada grupo de animais. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

5.3.3 ELISA - Análise dos níveis séricos de IgG

Na Figura 21 estão apresentados os gráficos representativos da produção de IgG nos animais imunizados.

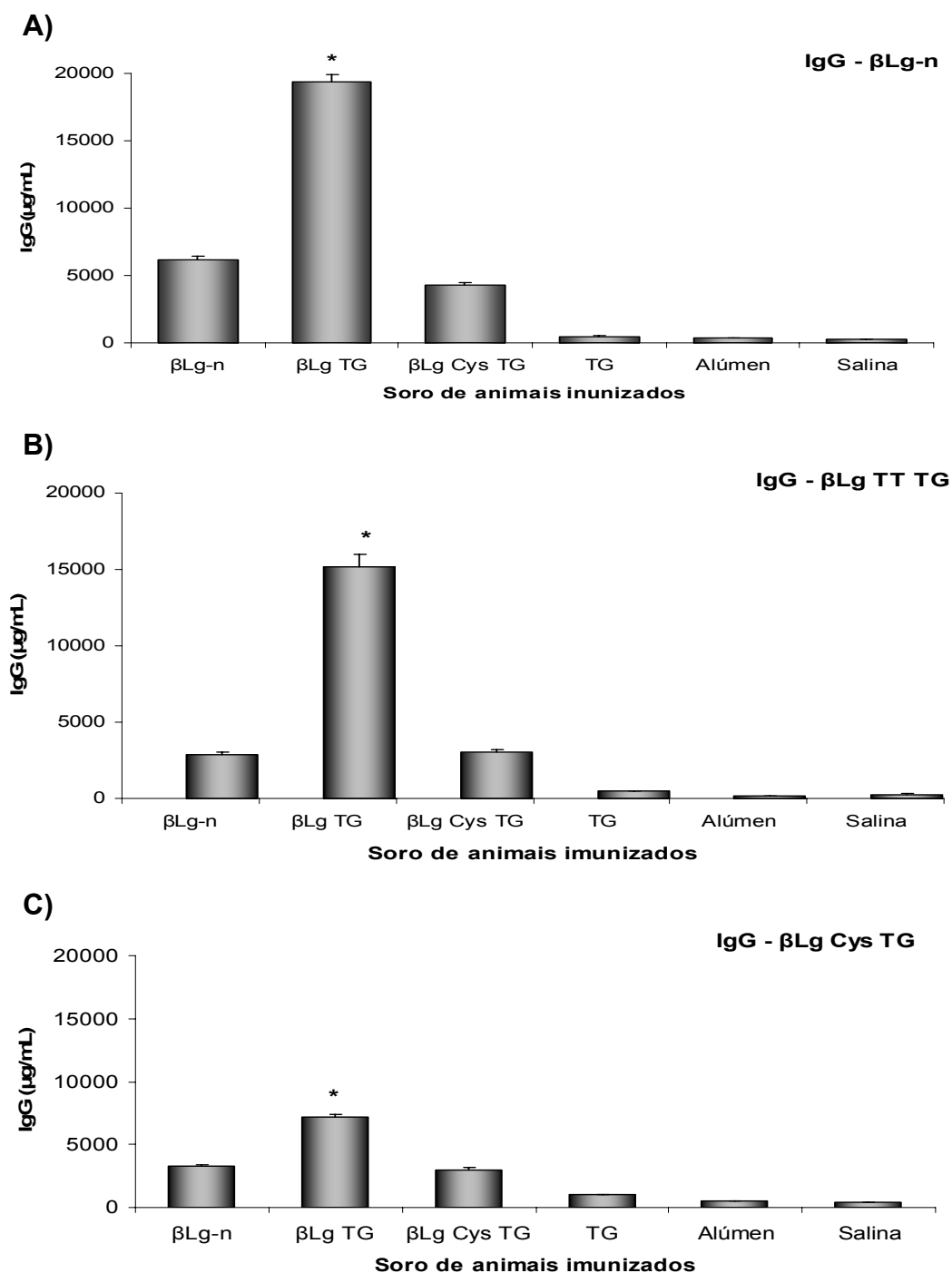


Figura 21. Níveis séricos de IgG no soro de animais imunizados com a proteína nativa (β Lg-n), tratada termicamente e polimerizada com TG (β Lg TG), polimerizada na presença de Cys (β Lg Cys TG) e grupos CT TG, alúmen e salina, avaliados contra (A): β Lg-n, (B): β Lg TG, (C): β Lg Cys TG. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Na Figura 21A estão expressos os valores de IgG contra β Lg-n. Os grupos controles (salina, alúmen e TG) apresentaram níveis entre 246,5 μ g/mL (salina) e 479,4 μ g/mL (TG) enquanto os grupos imunizados com as proteínas teste apresentaram concentração de IgG muito superior ao obtido pelos grupos controles: β Lg TT TG, 19.395,3 μ g/mL; β Lg-n, 6.188,2 μ g/mL e β Lg Cys TG, 4.271,1 μ g/mL.

Os valores de IgG contra β Lg TT TG nos grupos controles (Figura 21B) foram 278,5 μ g/mL (CT salina), 140,8 μ g/mL (CT alúmen) e 459,5 μ g/mL (CT TG), próximo ao verificado contra a β Lg-n. Os níveis de IgG mais elevados no grupo imunizado com β Lg TT TG, 15.149,9 μ g/mL, foram cerca de 5 vezes superiores aos dos grupos imunizados com β Lg-n (2.900,0 μ g/mL) e β Lg Cys TG (3.053,2 μ g/mL) ($p < 0,05$).

Contra a β Lg Cys TG (Figura 21C), os grupos controles TG, alúmen e salina apresentaram níveis de IgG 989,2 μ g/mL, 419,6 μ g/mL e 507,2 μ g/mL, respectivamente. Estes valores foram significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos dos demais grupos analisados frente a esta amostra: 7.137,1 μ g/mL para o grupo imunizado com β Lg TT TG; 3.260,2 μ g/mL para o grupo imunizado com β Lg-n e 2.953,6 μ g/mL no grupo imunizado com β Lg Cys TG. Similarmente ao obtido na análise de IgE, o grupo imunizado com β Lg TT TG apresentou respostas significativamente aumentadas de IgG contra todas as proteínas avaliadas comparada aos grupos imunizados com β Lg-n e β Lg Cys TG ($p < 0,05$).

Analisando-se em separado os níveis séricos de IgG específicas de cada grupo de animais frente a proteína utilizada na imunização (Figura 22), verificou-se diferenças estatísticas entre os grupos, sendo que valores significativamente mais elevados ($p < 0,05$) foram encontrados os do grupo imunizado com β Lg TT TG (15.149,9 μ g/mL). Valores estatisticamente menores ($p < 0,05$) foram encontrados para o grupo imunizado com β Lg Cys TG (2.953,6 μ g/mL), enquanto o grupo imunizado com a β Lg-n apresentou níveis séricos de IgG 6.188,4 μ g/mL.

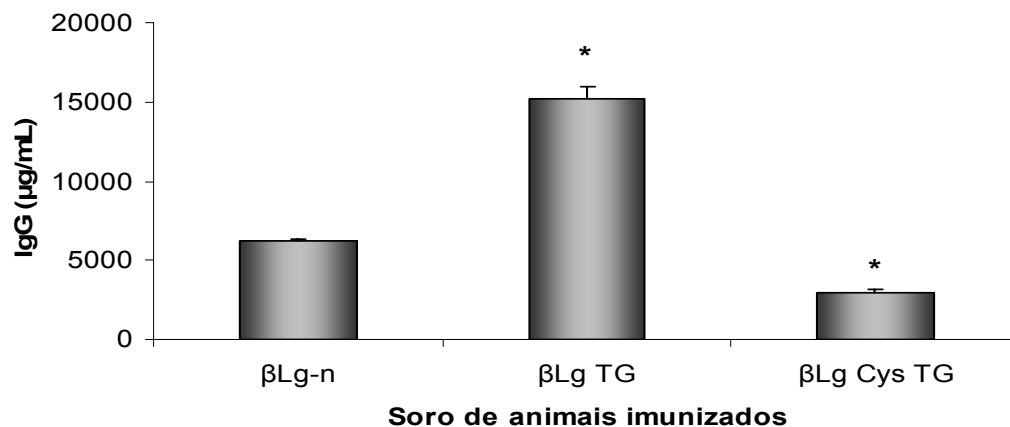


Figura 22. Gráfico representativo da produção de IgG específica frente à proteína utilizada na imunização de cada grupo de animais. * Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Diferente do observado na análise de IgE, a amostra βLg TT TG utilizada como imunógeno levou à maior produção de anticorpos da classe IgG, com capacidade de sensibilização superior à βLg-n.

No presente experimento, a β-Lg nativa induziu respostas de anticorpos IgE e IgG elevadas nos animais com ela imunizados. A β-Lg tem sido considerada o constituinte alergênico mais importante encontrado no leite de várias espécies animais Otani et al. (1985) e Kurisaki et al. (1982) mostraram que a estrutura terciária da β-Lg era necessária para sua imunorreatividade. Clement et al. (2002) realizaram estudo sobre a antigenicidade da β-Lg, utilizando anticorpos monoclonais (mAb). Os autores verificaram que havia regiões antigênicas não só na α-hélice e arcos externos, mas também as folhas-β continham epítomos. Segundo Selo et al. (1999) e Wal (2001), um dos peptídeos caracterizados como sendo mais imunorreativos presentes na estrutura da β-Lg são Val⁴¹-Lys⁶⁰ presentes na superfície da molécula de β-Lg intacta.

Quando imunizados com a β-Lg tratada termicamente e modificada com TG, os animais também apresentaram níveis de IgE elevados e de IgG superiores aos verificados nos animais imunizados com βLg-n. Estes resultados podem ser devidos às alterações conformacionais na estrutura da proteína, com exposição de

epítomos antes ocultos na β -Lg em decorrência do tratamento térmico e/ou da posterior polimerização com transglutaminase. O desdobramento da cadeia polipeptídica ou mesmo à formação de novos sítios antigênicos pode aumentar a imunorreatividade da β -Lg devido à exposição dos epítomos (MERZEJEWSKA e KUBICKA 2006).

Estudos de Wal (2001) e Selo et al. (1999) sobre a ligação da β -Lg com a IgE mostraram que esta imunoglobulina se manifesta na presença de um epítipo de cadeia linear curta (Val⁹² – Lys¹⁰⁰), localizado no centro hidrofóbico da molécula de proteína, inacessível na molécula em estado nativo. Alterações estruturais nas moléculas podem expor peptídeos alergênicos, os quais têm sido reconhecidos por IgE específicas do plasma de indivíduos alérgicos, causando reação adversa (SÉLO et al., 1999). Clare et al. (2007) verificaram que proteínas do amendoim tratadas termicamente e polimerizadas com transglutaminase não apresentaram diminuição da resposta imunogênica, conservando alta capacidade de ligação com anticorpos IgE, similar ao observado para as frações não tratadas.

Apesar dos animais terem produzido imunoglobulinas específicas contra a proteína modificada quando imunizados com a β -Lg polimerizada com transglutaminase na presença de Cys, a produção foi inferior às de imunoglobulinas específicas produzidas pelos grupos imunizados com β Lg-n e β -Lg TT TG, sugerindo que a presença de cisteína na polimerização da β -Lg com transglutaminase pode levar à mudanças estruturais que diminuem a exposição de epítomos e, conseqüentemente, a antigenicidade da proteína. Babiker et al. (1998) verificaram que a modificação da soja com TG levou ao mascaramento de determinantes antigênicos nas proteínas e redução da alergenicidade, verificada por teste de *Immunoblotting* e ELISA com soro de pacientes alérgicos às proteínas da soja. Watanabe et al. (1994) constataram que tanto o tratamento brando como mais severo das frações solúveis e insolúveis do trigo com enzima TG diminuiram a resposta alérgica à este produto ao mascarar sítios de ligação com anticorpos IgE nas proteínas, após formação de ligações cruzadas.

Os resultados sugerem que, em modelo experimental, a proteína polimerizada com transglutaminase na presença de agente redutor Cys, pode promover alterações que diminuem a produção de anticorpos e conseqüentemente a resposta antigênica da β -Lg, comparada à resposta induzida pela proteína nativa.

6. Conclusões

O tratamento térmico prévio da β -Lactoglobulina seguido da reação de polimerização com enzima transglutaminase levou à formação de polímeros de massa molar > 100 kDa. Grau de polimerização mais elevado foi observado nas amostras com maior concentração de proteína (5% e 7%).

A presença de agente redutor Cys favoreceu mais a polimerização das amostras do que o tratamento térmico prévio da proteína.

A polimerização da β -Lg na presença de agente redutor Cys promoveu menor produção de níveis séricos de IgE e IgG nos animais, comparada ao grupos que receberam β -Lg nativa e β -Lg tratada termicamente e polimerizada com TG, sugerindo que a polimerização na presença de agente redutor Cys pode reduzir o potencial antigênico ao modificar e/ou ocultar regiões de epítomos na proteína.

7. Referências Bibliográficas

- ABOUMAHMOUD, R.; SAVELLO, P. Crosslinking of whey protein by transglutaminase. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.2, p.256-263, 1990.
- ADEL-PATIENT, K.; NAHORI, M. A.; PROUST, B.; LAPA E SILVA, J. R.; CRÉMINON, C.; WAL, J. M.; VARGAFTIG, B. B. Elicitation of the allergic reaction in β -lactoglobulin – sensitized Balb/c mice: biochemical and clinical manifestations differ according to the structure of the allergen used for challenge. **Clinical Experimental Allergy**, v. 33, n.3, p. 376-385, 2003.
- ADEL-PATIENT, K.; CRÉMINON, C.; BERNAND, H.; CLEMENT, G.; NEGRONI, L. L. FROBERT, Y.; GRASSI, J.; WAL, J. M.; CHATEL, J. M. Evaluation of a high IgE-responder mouse model of allergy to bovine β -lactoglobulin (BLG): development of sandwich immunoassays for total and allerg-specific IgE, IgG1 and IgG2a in β -lactoglobulin - sensitized mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 235, n.1, p. 21-32, 2000.
- ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K; MATSUURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokio, v. 53, n. 10, p. 2613-2617, 1989.
- AOAC. Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemistry**, 16 ed. Arlington: AOAC, 1995.
- ASSELIN, J.; HEBERT, J.; AMIOT, J. Effects of in vitro proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. **Journal of Food Science**, v.54, p. 1037-1039. 1989.
- BABIKER, E.E.; HIROYUKI, A.; MATSUDOMI, N.; IWATA, H.; OGAWA, T.; BANDO, N.; KATO, A. Effect of Polysaccharide Conjugation or Transglutaminase Treatment on the Allergenicity and Functional Properties of Soy Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n.3, p. 866-871, 1998.

- BARRET, J.T. **Textbook of immunology: an introduction to immunochemistry and immunobiology**. 5^a ed. St. Louis: Ed. C. V. Mosby Company, p. 25-214. 1988.
- BERNARD, H.; NEGRONI, L.; CHATEL, J. M.; CLEMENT, G.; ADEL-PATIENT, K.; PELTRE, G.; CRÉMINON, C.; WAL, J. M. Molecular basis of IgE cross-reactivity between human β -casein and bovine β -casein, a major allergen of milk. **Molecular Immunology**, v. 37, n.3, p. 161-167, 2000.
- BONOMI, F.; FIOCCHI, A.; FRØKIAER, H.; GAIASCHI, S.I.; POIESI, C.; RASMUSSEN, P.; RESTANI, P. Reduction of immunoreactivity of β -Lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. **Journal of Dairy Research**. v.70, n.1, p. 51-59, 2003.
- BRITO, R. B. S. L.. **Modulação da resposta imunológica (Th2/Th1) em camundongos BALB/c previamente sensibilizados com ovalbumina (OVA) e injetados com microesferas de PLGA encapsuladas com OVA**. 2006, 76 p. Dissertação (Mestre em Clínica Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- BROWNLOW, S.; CABRAL, J.H.; COOPER, R.; FLOWE, D.; YEWDALL, S.; POLIKARPOV, I.; NORTH, A.; SAEYER, L. Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still an enigmatic lipocalin. **Structure**, v.5, n.4, p. 481-495, 1997
- CARTER, D.C.; HO, J.X. Structure of serum albumin. **Advances in Protein Chemistry**. 1994.
- CHISTENSEN, B.M.; SORENSEN, E.S.; HOJRUP, P.; PETERSEN, T.E., RASMUSSEN, L.K. Localization of potential transglutaminase cross-linking sites bovine caseins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.7, p.1943-1947, 1996.
- CHIANG, H.T., CHING, Y.M. Modulation of the thermal stability of β -lactoglobulin by transglutaminase treatment. **European Food Research Technology**, v. 225, n.5, p. 649-652, 2007.

- CLARE, D.A.; GHARST, G.; SANDERS, T.H. Transglutaminase Polymerization of Peanut Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n.2, p. 432-438, 2007.
- CLEMENT, G.; BOQUET, D.; FROBERT, Y.; BERNARD, H.; NEGRONI, L.; CHATEL, J.M.; ADEL-PATIENT, K.; CREMINON, C.; WAL, J.M.; GRASSI, J. Epitopic characterization of native β -Lactoglobulin. **Journal of Immunological Methods**, v.266, n.1, p. 67-78, 2002.
- COPELAND, R.A. **Methods for protein analysis: a practical guide to laboratory protocols**, Chapman e Hall, 1993.
- CORDLE, C.L. Control of Food Allergies Using Protein Hydrolysates. **Food Technology**, v.48, n.10, p.72-76, 1994.
- COZZOLINO, A.; DI PIERRO, P.; MARINIELLO, L.; SORRENTINO, A.; MAIS, P.; PORTA, R. Incorporation of whey proteins into cheese curd by using transglutaminase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.38, n.3, p.289-295, 2003.
- DUMAY, E.M.; KALICHEVKY, M.T.; CHEFTEL, J.C. High-pressure unfolding and aggregation of β -lactoglobulin and the baroprotective effects of sucrose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1861-1868, 1994.
- EIGEL, W.N.; BUTLER, J.E.; ERNSTROM, C.A., FARREL, H.M.; HARWALKER, V.R.; JENNES, R.; WHITNEY, R.M. Nomenclature of proteins of cow's milk. **Journal of Dairy Sciences**, v.67, p.1599-1631, 1984.
- EISSA, A.S., BISRAM, S. KHAN, S.A. Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.52, n.14, p. 4456-4464, 2004.
- EISSA, A. S.; PUHL, C.; KADLA, J. F.; KHAN, S. A. Enzymatic Cross-Linking of β -Lactoglobulin: Conformational Properties Using FTIR Spectroscopy. **Biomacromolecules**, v.7, n.6, p.1707-1713, 2006.

- EISSA, A.S.; KHAN, S.A. Modulation of hydrophobic interactions in denatured whey proteins by transglutaminase enzyme. **Food Hydrocolloids**, v.20, n.4, p. 543-547, 2006.
- FAERGEMAND, M.; OTTE, J.; QVIST, K.B.; Enzymatic cross-linking of whey protein by Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*. **Food Hydrocolloids**, v.11, n. 1, p. 19-25, 1997.
- FAERGEMAND, M.; QVIST, K.B. On the importance of using a Ca^{+2} independent transglutaminase for cross-linking of β -lactoglobulin. **Food Hydrocolloids**, v.13, n.3, p. 199-201, 1999.
- FERGUNSON, A. C. Food allergy. **Progr. Food Nutrition Science**, v.8, p. 77-107, 1984.
- FOLK, J.E.; FINLAYSON, J.S. The e-(γ -glutamyl) lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. **Advances in Protein Chemistry**, v.31, p.1-133, 1977.
- FOLK, J.E.; COLE, P.W. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 241, n. 23, p. 5518-5525, 1966.
- FORT, N.; CARRETERO, C.; PARÉS, D.; TOLDRA, M.; SAGUER, E. Combined treatment of porcine plasma with microbial transglutaminase and cysteine: effects on the heat-induced gel properties. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n.3, p. 463-471, 2007.
- GAUDRY, P. A.; FERNANDES, J.; REISH, R.; ROUX, K. H.; SATHE, S. K.; TEUBER, S. S.; REESE, G.; LEHRER, S. B.; Murine IgE and IgG antibody responses to allergenic and non-allergenic foods: potential model for allergenicity assessment of foods in man. **Journal of allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n.2, p. S234, 2004.
- HALL, G.M. **Methods of testing protein functionality**, 1 ed. London: Chapman e Hall, 1996.

- HELM, R.M.; BURKS, A.W. Mechanism of food allergy. **Current Opinion in Immunology**. v.12, p.647-653, 2000.
- HOFFMANN, M.A.M.; MILL, P.J.J.M. Heat-Induced Aggregation of β -Lactoglobulin: Role of the Free Thiol Group and Disulfide Bonds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n.3, p. 2942-2948, 1987.
- HUDSON, L.; HAY, F.C. **Practical Immunology**, 3 ed. Blackwell Scientific Publications. 1989.
- IAMETTI, S.; GREGORI, B.; VECCHIO, G.; VECCHIO, G.; BONOMI, F. Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β -lactoglobulin. **European Journal of Biochemistry**, v. 237, n.1, p. 106-112, 1996.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**, 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- JEDRYCHOWSKI, L.; WROBLEWSKA, B. Reduction of the antigenicity of whey proteins by lactic and fermentation. **Food and Agricultural Immunology**. v.11, n.1, p.91-99, 1999.
- JIANG, S.T.; HSIEH, J.F.; HO, M.L.; CHUNG, Y.C. Combination Effects of Microbial Transglutaminase, Reduction Agent, and Protease Inhibitor on the Quality of Hairtail Surimi. **JSF: Food Chemistry and Toxicology**, v. 65, n.2, p. 241-254, 2000.
- JONG, G.A.H.; KOPPELMAN, S.J. Transglutaminase Catalyzed Reactions: Impact on Food Applications. **JFS: Concise Reviews and Hypotheses in Food Science**. V. 67, n.8, p. 2798- 2806, 2002.
- KANAJI, T.; OZAKI, H.; TAKAO, T.; KAWAJIRI, H.; IDE, H.; MOTOKI, M. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. strain-S-8112. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 16, p. 11565-11572, 1993.

- KASHIWAGI, T.; TOKOYAMA, K.; ISHIKAWA, K.; ONO, K.; EJIMA, D.; MATSUI, I. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovocillium mobaraense*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44252-44260, 2002.
- KLEBER, N.; KRAUSE, I.; ILLGNER, J.H. The antigenic response of β -Lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation. **European Food Research Technology**. v.219, n.2, p. 105-110, 2004.
- KOPPELMAN, S. J.; HEFLE, S. L. **Detecting allergens in food**. 1 ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2006.
- KURISAKI, J.; NAKAMURA, S.; KAMINOGAWA, S. YAMAUCHI, K. The antigenic properties of β -lactoglobulin examined with mouse IgE antibody. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v. 46, n.8, p. 2069-2075, 1982.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAUBER, S.; NOACK, I.; KLOSTERMEYER, H.; HENLE, T. Oligomerization of β -lactoglobulin by microbial transglutaminase during high pressure treatment. **European Food Research and Technology**, v.213, n.3, p. 246-247, 2001.
- LINDBLAD, E.B. Aluminium compounds for use in vaccines. **Immunology and Cell Biology**, v.82, n.5, p. 497-505, 2004.
- LEE, J.W.; KIM, J.H.; YOON, H.S.; KANG, K.O.; LEE, S.Y.; HWANG, H.J.; BYUN, M.W.. Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. **Journal of Food Protein**. v.64, n.2, p.272-276, 2001.
- MAKINEN-KILJUNEN, S.; PALOSUO, T. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of bovine beta-lactoglobulin in infant feeding formulas and in human milk. **Allergy**. v. 47, p.347-352, 1992.
- MIERZEJEWSKA, D.; KUBICKA, E. Effect of temperature on immunoreactive properties of the cow milk whey protein β -lactoglobulin. **Milchwissenschaft**, v.61, n.1, p.69-72, 2006.

- MIZUMACHI, K.; KURISAKI, J. Induction of oral tolerance in mice by continuous feeding with β -lactoglobulin and milk. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n.6, p. 1287-1294, 2002.
- MONACI, L.; TREGOAT, V.; VAN HENGEL, A.J.; ANKLAM, E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. **European Food Research and Technology**, v.223, n.2, p. 149-179, 2006.
- MONACO, H.L.; ZANOTTI, G.; SPADON, P.; BOLOGNESI, M.; SAEYER, L.; ELIOPOULOS, E.E. Cristal structure of the trigonal form of bovine β -lactoglobulin and its complex with retinol at 2.5 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.197, n.4, p.695-706, 1987.
- MORGAN F.; BOUHALLAB S.; MOLLE D.; HENRY G.; MAUBOIS JL; LEONIL J. Lactolation of beta-Lactoglobulin Monitored by Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. **International Dairy Journal**, v.8, n.2, p. 95-98,1998.
- MOTOKI, M.; NIO, N. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. **Journal of Food Science**. v.48, n.2, p.561-566, 1983.
- MOTOKI, M.; NIO, N.; TAKIMANI, K. Funcional properties of food proteins polymerized by transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v.48, n.5, p.1257-1261, 1984.
- MOTOKI, M., SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, n.5, p. 204-210, 1998.
- NATALE, M.; BISSON, C.; MONTI, G.; PELTRAN, A.; GAROFFO, L.P.; VALENTINI, C.F.; BERTINO, E.; CASCIA, A.; CANTI, A. Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.48, n.5, p. 363-369, 2004.
- OTANI, H.; UCHIO, T.; TOKITA, F. Antigenic reactivities of chemically modified β -lactoglobulins with antiserum to bovine β -lactoglobulin. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v.49, p. 2531-2536, 1985.
- PACHECO, M.T.; DIAS, N.F.G.; BALDINI, V.L.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados

- protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.2, p. 333-338, 2005.
- PAHUD, J.J.; MONTI, J.C.; JOST, R. Allergenicity of whey protein: its modification by tryptic in vitro hydrolysis of the protein. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**. v.4, n.3, p.408-413, 1985.
- PAPIZ, M.Z.; SAEYER, L.; ELIOPOULOS, E.E.; NORTH, A.C.T.; FINDLAY, J.B.C.; SIVAPRASADARAO, R.; JONES, T.A.; NEWCOMER, M.E.; KRAULIS, P.J. The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. **Nature**, v.324, n.6095, p.383-385, 1986.
- PEDERSEN, M. H.; HANSEN, T. K.; STEN, E.; SEGURO, K.; OHTSUKA, T.; MORITA, A., BINDSLEV-JENSEN, C.; POULSEN, L. K. Evaluation of the potential allergenicity of the enzyme microbial transglutaminase using the 2001 FAO/WHO decision tree. **Molecular Nutrition and Food Research**. v.48, n.6, p. 434-440, 2004.
- PEÑAS, E.; SNEL, H.; FLORIS, R.; PRÉSTAMO, G.; GOMEZ, R. High pressure can reduce the antigenicity of bovine whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.969-975, 2005.
- POMS, R. E.; KLEIN, C. L.; ANKLAN, E. Methods for allergen analysis in food: a review. **Food Additives e Contaminants**, v.21, n.1, p. 1 – 31, 2004.
- PUERTA, A.; DIEZ-MASA, J.C.; FRUTOS, M. Immunochromatographic determination of β -lactoglobulin and its antigenic peptides in hypoallergenic formulas. **International Dairy Journal**, v.16, n.5, p. 406-414, 2006.
- RESTANI, P.; VELONA, T.; PLEBANI, A.; UGAZIO, A.G.; POIESI, C.; MURARO, A.; GALLI, C.L. Evaluation bt SDS-PAGE and Immunblotting of residual antigenicity in hydrolysed protein formulas. **Clinical and Experimental Allergy**, v.25, n.7, p.641-658, 1995.
- RESTANI, P.; BALLABIO, C.; CATTANEO, A.; ISOARDI, P.; TERRACCIANO, L. FIOCCHI, A. Characterization of bovine serum albumin epitopes and their

- role in allergic reactions Allergy. **Allergy Supplement**. v.59, n.78, p.21-24, 2004.
- RODRIGUEZ-NOGALES, J. M. Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cows' milk: A statistical approach. **International Dairy Journal**, v.16, n.1, p. 26-32, 2006.
- SCHIMIDT, R. H.; ILLINGWORTH, B. L.; DENG, J. C. CORNELL, J. A. Multiple regression and response surface analysis of the effects of calcium chloride and cysteine on heat-induced whey protein gelation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, n.3, p. 529-532, 1979.
- SÉLO, L.; CLÉMENT, G.; BERNARD, H. Allergy to bovine -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. **Clinical and Experimental Allergy**. v.29, n.12, p.1696-1704, 1999.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**, São Paulo: Livraria Varela, 1996.
- SHARMA, R.; ZAKORA, M.; QUIST, K.B. Susceptibility of na industrial α -lactalbumin concentrate to cross-linkin by microbial transglutaminase. **International Dairy Journal**, v.12, n.1, p. 1005-1012, 2001.
- SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**, 3ed. São Paulo: Manole, 2003.
- SPIEGEL, T.; HUSS, M. Whey protein aggregation under shear conditions: effects of pH-value and removal of calcium. International. **Journal of Food Science and Technology**, v.37, n.5, p.559, 2002.
- TANG, C-H.; MA, C-Y. Modulation of the thermal stability of β -lactoglobulin by transglutaminase treatment. **European Food Research Technology**, v.225, n.5-6, p. 649-652, 2007.
- TANIMOTO, S.Y.; KINSELLA, J.E. Enzymic modification of proteins: effects of transglutaminase cross-linking on some physical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, n.4, p.281-285, 1988.

- TAYLOR, S. L.; LEMANSKE, R. F.; BUSH, R. K.; BUSSE, W. W. Food allergens: structure and immunologic properties. **Annals of Allergy**, v.59, n.5, p. 93-9, 1987.
- TRAORÉ, F.; MEUNIER, J. C. Cross-Linking activity of placental F XIII, on whey proteins and caseins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, n.3, p.399-402, 1992.
- VAN BERESTEIJN, E. C. H.; PEETERS, R.A.; KAPER, J.; MEIJER, R.J.G.M.; ROBBEN, A.J.P.M.; SCHMIDT, D.G. Molecular Mass Distribution, Immunological Properties and Nutritive Value of Whey Protein Hydrolysates. **Journal of Food Protection**. v.57, n.7,p. 619- 625, 1994.
- VILJANEN, M.; SAVILAHTI, E.; HAAHTELA, T.; JUNTUNEN-BACKMAN, K. Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. **Allergy**. v.60, n.4, p.494-500, 2005.
- WAL, J.M. Structure and function of milk allergens. **Allergy**, v.56, n.67, p. 35-38, 2001.
- WATANABE, M., SUZUKI, T., IKENZACA, Z.; ARAI, S. Controlled enzymatic treatment of wheat protein for productions of hypoallergenic flour. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.58, n.11, p. 388-490, 1994.
- WRÓBLEWSKA, B.; JEDRYCHOWSKI, L. Influence of enzymatic cow milk hydrolysates on IgA and IgG response of Balb/c mice organism. **Czech Journal of Food Science**, v.23, n.2, p. 51-63. 2005.
- ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial transglutaminase—a review of its production and application in food processing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.44, n.3-4, p. 277–282, 1995.
- ZINSLY, P.F.; SGARBIERI, V.C.; PEREIRA DIAS, N.F.G.; JACOBUCCI, H.B.; PACHECO, M.T.B.; BALDINI, V.L.S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v.4, n.4, p.1-8, 2001.



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

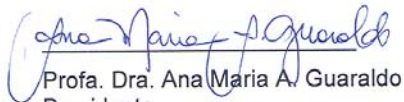
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1203-1, sobre "Efeito da Enzima transglutaminase na antigenicidade da beta-lactoglobulina", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Flávia Maria Netto / Mariana Battaglin Villas Boas, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 27 de fevereiro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1203-1, entitled "Effect of the enzyme transglutaminase in the antigenicity of the beta-lactoglobulin", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 27, 2007.

Campinas, 27 de fevereiro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB - Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>