

## **4.1 – Métodos**

### **4.1.1 – Extracção dos alergénios hidrofóbicos do látex de borracha natural**

A extracção dos alergénios hidrofóbicos Hev b 1 e Hev b 3, foi realizada segundo dois métodos descritos na literatura (Durauer *et al.*, 2000; Wititsuwannakul *et al.*, 2008) com a introdução de algumas modificações.

#### **4.1.1.1 Extracção do soro C**

Pesaram-se 45 gramas de látex amoniado e procedeu-se a uma centrifugação de 15500 rpm durante 60 minutos, a 4 °C. Adicionou-se de sulfato de amónio até se fazer uma saturação de 25% de saturação, a solução foi a agitar durante 30 minutos, a 4 °C. Centrifugou-se o precipitado a 3500 rpm durante 20 minutos, a 4 °C. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com adição de sulfato de amónio até se obter uma saturação de 50%. O precipitado foi centrifugado a 3500 rpm durante 20 minutos, a 4 °C, foi adicionado sulfato de amónia até se obter uma saturação de 75%. A solução foi precipitada novamente a 3500 rpm durante 20 minutos, a 4 °C (Wagner *et al.*, 2007).

#### **4.1.1.2 Extracção pelo método de Durauer**

Pesaram-se 30 gramas de latex amoniado e fez-se uma diluição de 1:2 com uma solução de tampão de Tris 50 mM, pH 8,0 contendo 0,01% de Triton X-100. A solução foi homogeneizada e centrifugada durante 50 minutos, a 15500 rpm, a 10 °C, e em seguida retirou-se a parte aquosa e guardou-se o sobrenadante. Perfez-se a massa inicial de 30 gramas, adicionando tampão de Tris 50 mM, pH 8,0 ao sobrenadante e realizou-se outra centrifugação nas mesmas condições. Retirou-se a parte aquosa e colocou-se o sobrenadante numa solução de SDS a 2%. Agitou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente, as partículas de borracha existentes foram removidas da solução através de três centrifugações de 15 minutos a 15500 rpm a uma temperatura de 10 °C.

O SDS foi retirado da amostra através de uma filtração em gel utilizando uma coluna Sephadex G-25 (97 x 25 mm) utilizando acetato de amónio 0,1M e pH 6.8 como

eluente. Injectou-se 100 uL de amostra, operou-se a um caudal de 0,5 mL/min e recolheram-se fracções de 2 mL.

Devido à diluição associada a este tipo de cromatografia, as fracções obtidas foram concentradas até um volume de 5 mL, usando um concentrador da Amicon de 50 mL, modelo 8050, à pressão de azoto gasoso de aproximadamente 2 bar e utilizando membranas de celulose regenerada da Millipore, com um limite nominal de exclusão molecular de (NMWL) de 1000 Da.



#### **4.1.1.3 Extracção pelo método de Wititsuwannakul**

Pesaram-se 30 gramas de látex amoniado, em seguida adicionaram-se 5 volumes de Triton X-100 a 0,2%. A mistura foi deixada em agitação durante a noite a 4° C e centrifugada a 10.000g durante 10 minutos, a 4° C e guardou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 2 volumes de acetona fria e colocou-se a amostra durante 10 minutos em gelo, depois fez-se uma centrifugação a 10.000g durante 10 minutos, a 4° C e guardou-se o precipitado.

Dissolveu-se o precipitado em 50 mM de Tris-HCl com pH de 7.4 e voltou-se a centrifugar a 40.000g durante 10 minutos, a 4° C, para se obter o sobrenadante. Aqueceu-se o sobrenadante a 70° C, durante 5 minutos e colocou-se logo em seguida em gelo durante 10 minutos. Centrifugou-se durante 10 minutos a 40000g a uma temperatura de 4° C para remover o precipitado e ficar com a amostra final.



#### **4.1.2 – Caracterização dos alergénios do látex de borracha natural**

##### **4.1.2.1 – Determinação da concentração de proteína**

A concentração da proteína nas amostras de látex de borracha natural foi determinada, utilizando o método descrito por Bradford. Esta técnica baseia-se na interacção do corante específico, Azul de Coomassie G-250, com as ligações peptídicas das proteínas solúveis, originando uma alteração na cor do corante, de vermelho acastanhado ( $A_{\text{máx}}=465$  nm) para azul ( $A_{\text{máx}}=595$  nm), e promovendo um aumento de absorvência da mistura analítica proporcional à concentração de proteína. Este teste tem uma sensibilidade de 0,1-1,0 mg/mL.

O reagente de Coomassie foi preparado dissolvendo 100 mg de azul brilhante de Coomassie G-250 em 50 ml de etanol e adicionando depois, 100 ml de ácido fosfórico 85 %. Após diluição para um volume final de 1 L, esta solução foi filtrada e armazenada em local escuro.

O método de determinação da concentração de proteína consistiu na adição de 2,5 mL do reagente de Bradford a 50  $\mu$ L de amostra, seguida de homogeneização por agitação. Após repousar durante cinco minutos, leram-se as amostras a uma absorvência de 595 nm, tomando como branco o tampão fosfato salino (0,01 M e pH=7,4).

As curvas de calibração para a quantificação da proteína foram obtidas usando padrões de diferentes concentrações de albumina sérica bovina (0,2 mg/mL-1,0 mg/mL), sujeitos ao protocolo anterior.

##### **4.1.2.2 – Preparação dos suportes cromatográficos**

O suporte cromatográfico utilizado no trabalho foi o Epóxi-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-Sephrose. Este gel foi preparado por ligação covalente do 1,4-bis-(2,3-epóxi-propóxido) de butilo à Sepharose CL-6B.

Para a obtenção de 1g de gel, juntou-se a 1g de Sepharose CL-6B previamente lavada com água destilada, 1 mL de 1,4-bis-(2,3-epóxi-propóxido) de butilo e 1ml de uma solução de hidróxido de sódio 0,6 M contendo 2 mg de borohidreto de sódio por mL. Após agitação da suspensão, durante 8 horas num banho, à temperatura de 25°C,

interrompeu-se a reacção por lavagem extensa com largos volumes de água destilada. Em seguida deixou-se o gel durante a noite à temperatura ambiente em NaOH 1M e no dia seguinte lavou-se com largos volumes de água destilada.

#### **4.1.2.3 – Cromatografia de interacção hidrofóbica**

Nos ensaios de cromatografia de interacção hidrofóbica foi utilizado um gel de Sepharose CL-6B modificada por ligação covalente de 1,4-bis-(2,3-epóxi-propóxido) de butilo. A coluna com um diâmetro de 1,6 cm e uma altura de 9,3 cm foi previamente equilibrada em tampão PBS 0,01 M, pH=7 com diferentes concentrações de sulfato de amónio, dependendo do ensaio. O volume das amostras injectadas na coluna foi de 100 µL de extracto de proteínas do látex. A força iónica das amostras foi ajustada pela adição de sal em concentração igual à do tampão usado na sua adsorção ao suporte. A eluição foi efectuada por diminuição da força iónica do eluente, sendo usado o PBS 0,01 M, pH=7. Todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente. O caudal utilizado foi de 0,5 mL/min e foram recolhidas fracções de 2 mL que foram analisadas quanto ao seu conteúdo em proteína pelo método de Bradford, electroforese SDS-PAGE e, em alguns casos, por ELISA.

Uma vez que as diferentes fracções obtidas após injeção dos 100 µL de amostra, se encontravam diluídas, foi necessário a realização de séries de 6 ensaios para cada tipo de amostra a analisar. Posteriormente, estas fracções foram concentradas em unidades Centricom 30 (Millipore) e centrifugadas a 5000g, durante 30 min (vários ciclos) à temperatura de 4°C, obtendo-se um volume final de 100 µL de amostra. Para recuperar a amostra, colocou-se novamente a centrifugar com o tubo invertido a 700g, durante 2 min, à temperatura de 4°C.

#### **4.1.2.4 – Electroforese SDS-PAGE**

A electroforese SDS-PAGE foi usada na análise da distribuição dos pesos moleculares das proteínas nas amostras de látex de borracha natural e também de algumas fracções obtidas após HIC.

Para a realização das electroforeses utilizou-se um sistema vertical descontínuo, constituído por uma placa de vidro e uma placa de alumina, separadas por espaçadores,

os quais permitem que o gel seja obtido. Este gel é constituído por duas camadas, uma inferior, o gel de migração (12,5 (p/v)), e uma superior, o gel de concentração a 4%, estando a sua constituição resumida na tabela 4.4. A composição das soluções de acrilamida e dos tampões Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 estão descritas nas tabelas 4.4.1 e 4.4.2, respectivamente.

Posteriormente, à adição do gel de migração entre as placas até uma altura de 3-4 cm do topo, adicionou-se água, para controlar a polimerização e evitar que o gel fique rugoso. Após a polimerização do gel à temperatura ambiente durante cerca de 30 minutos, a água foi escorrida, colocou-se o pente para a formação dos poços, e finalmente foi adicionado o gel de concentração. Depois da polimerização deste gel à temperatura ambiente durante 30 minutos, retirou-se o pente. As placas contendo o gel foram colocadas no sistema de electroforese e imersas em tampão de migração (tabela 4.5).

As amostras a adicionar aos poços, foram preparadas por adição de 5 µl de tampão de redução (tabela 4.6) a 15 µl de amostra e colocadas num banho, a 100°C, durante 5 min. Para além das amostras, também se aplicou nos géis de poli(acrilamida) um marcador, com padrões de massas moleculares conhecidas (tabela 4.7), para a comparação e identificação das amostras em análise.

Das amostras tratadas, foram injectados 10 µl em cada poço, e iniciou-se a electroforese com uma corrente de 150 V e 40 mA. Quando se analisou somente um gel, a corrente aplicada foi de 150 V e 20 mA e colocou-se uma placa de vidro do lado oposto, com o sistema de refrigeração ligado. Após a electroforese retirou-se o gel e este foi sujeito a coloração pelo método de Coomassie (tabela 4.8). Primeiro, o gel foi colocado em solução de coloração, durante 30 min, com agitação suave. Depois foi transferido para a solução de descoloração I, onde ficou durante 30 min em agitação suave. Por último, foi colocado numa solução de descoloração II, onde permaneceu durante a noite sem agitação.

### **4.1.2.5 – Quantificação dos Alergénios do Látex por ELISA Fitkit®**

Para a determinação quantitativa do alergénio Hev b 3 foi usado o Fitkit® da Fit Biotech. Este método de ELISA, utiliza alergénios purificados e anticorpos monoclonais específicos, sendo por isso de uma sensibilidade elevada. Foram seguidas

as especificações de utilização do kit, que incluíam uma fase preparativa e uma fase de testes.

Na fase preparativa, foram reconstituídos os reagentes de teste, de acordo com as especificações incluídas no kit. Seguiram-se os testes com a utilização dos padrões de alérgénios e extractos do latex de borracha natural, aos quais foi adicionado tampão de ensaio, seguido de incubação durante uma hora, à temperatura ambiente com agitação constante.

Procedeu-se à lavagem das placas, por quatro passos sucessivos, e de seguida foi adicionado o conjugado enzimático, seguido de incubação durante trinta minutos, à temperatura ambiente e com agitação constante.

Novamente as placas foram lavadas e posteriormente foi adicionado o substrato, e incubado durante quinze minutos, à temperatura ambiente com agitação constante.

A reacção foi interrompida com uma solução de paragem fornecida no kit, e foram realizadas leituras a 414 nm. Com o traçado da curva de calibração, procedeu-se à determinação quantitativa do alérgénio Hev b 3 dos extractos de latex de borracha natural.

## **4.2 – Material e Equipamento:**

Para a realização do trabalho experimental foi usado, além do material de uso corrente no laboratório, o equipamento descrito em seguida.

### **4.2.1 – Extracção das proteínas do látex de borracha natural**

A extracção dos alérgénios do látex foi realizada a partir de NRL:

☞ Látex natural (preparado comercial) 500 mL

Para a realização da extracção de proteínas foi utilizado o seguinte material:

☞ Ultracentrífuga da marca Beckman coulter Óptima L-100 Xp

#### **4.2.2 – Caracterização dos alergénios do látex de borracha natural**

##### **4.2.2.1 – Determinação da concentração de proteína**

A concentração de proteína nos extractos da face interior, exterior e total das luvas de látex foi determinada pelo método descrito por Bradford, utilizando um espectrofotómetro Ultrospec 300 Pharmacia Biotech, e células com um percurso óptico de 1 cm.

##### **4.2.2.2 – Cromatografia de interacção hidrofóbica**

A HIC foi realizada num sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) da Amersham Pharmacia Biotech, constituído pelos seguintes elementos:

- Colector de fracções, modelo FRAC-100;
- Coluna da marca Pharmacia, contendo gel de epóxi-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-Sephacrose
- Controlador LCC-500;
- Detector de ultravioleta, modelo UV-1 (280nm);
- Duas bombas P-500;
- Registador, modelo REC-112;

##### **4.2.2.3 – Electroforese SDS-PAGE**

O sistema de electroforese utilizado nos ensaios experimentais foi uma unidade vertical Hoefer, modelo SE 250 Mighty Small II, com uma fonte de alimentação da Amersham Pharmacia Biotech e modelo EPS 600. O marcador utilizado na electroforese, com padrões de massas moleculares conhecidas, são da marca Amersham Pharmacia Biotech.

**4.2.2.4 – Equipamento diverso**

- Agitador de vórtice, Heidolph, modelo Reax 2000.
- Balança analítica Metler Toledo, modelo AG 204;
- Funil com membrana da marca Pall life Sciences, de 0,2 µm e diâmetro de 90mm;
- Medidor de pH Metrohm, modelo 620, com eléctrodo combinado de vidro Metrohm;
- Micropipetas automáticas da Eppendorf;
- Placas de aquecimento com sistema de agitação magnética (60 a 1600 rotações/min e temperatura máxima de 350°C), P. Seleta, modelo agimatic-E.

**4.2.2.5 – Reagentes**

**Tabela 4.4** – Preparação dos géis de poliacrilamida para electroforese SDS-PAGE.

<b>Soluções</b>	<b>Gel de migração 12,5% (p/v)</b>	<b>Gel de concentração 4% (p/v)</b>
Acrilamida	15 mL	1,25 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	7,5 mL	—
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	—	2,5 mL
Água destilada	7,1 mL	5,5 mL
SDS 10%	0,3 mL	90 µL
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	10 µL	8 µL
Persulfato de amónio (PSA)10 %	150 µL	20 µL
Volume final	30 mL	5 mL

**Tabela 4.4.1** – Preparação da solução de acrilamida

<b>Solução</b>	<b>Reagentes</b>	<b>Quantidades</b>
Acrilamida	Acrilamida	60,0 g
	Bis-acrilamida	1,6 g
	Água destilada	até 200 mL

**Nota:** Uma vez que este composto é neurotóxico, deve-se trabalhar de luvas e máscara na sua preparação.

**Tabela 4.4.2** – Preparação da solução Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 anteriores.

<b>Solução</b>	<b>Reagentes</b>	<b>Quantidades</b>
<b>Tris-HCl 1,5 M pH 8,8</b>	Tris	36,3 mg
	HCl (4N)	até pH 8,8
	Água destilada	até 200 mL
<b>Tris-HCl 0,5 M pH 6,8</b>	Tris	3,0 mg
	HCl (4N)	até pH 6,8
	Água destilada	até 50 mL

**Tabela 4.5** – Composição do tampão de migração.

<b>Tampão Tris 0,025 M pH 8,3</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Quantidades</b>
<b>Tris</b>	6,05 g
<b>Glicina</b>	28,8 g
<b>SDS</b>	2,0 g
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Perfazer até 2000 mL

**Tabela 4.6** – Tampão de redução da amostra.

<b>Tampão de redução</b>	
<b>Tris-HCl pH 6,8</b>	2,5 mL
<b>SDS 10%</b>	4,0 mL
<b>B-Mercaptoetanol</b>	0,2 mL
<b>Glicerol</b>	2,0 mL
<b>Azul de Bromofenol 0,2%</b>	0,2 mg
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	até 10,0 mL

**Tabela 4.7** – Coloração do marcador de altos pesos moleculares.

<b>Peso molecular</b>	<b>Cor</b>
250000	Azul
160000	Roxo
105000	Verde
75000	Laranja
50000	Roxo
35000	Azul
30000	Verde
25000	Laranja
15000	Amarelo
10000	Azul

**Tabela 4.8** – Soluções para coloração e revelação de géis de SDS-PAGE.

	<b>Reagentes</b>	<b>Quantidades</b>
<b>Solução de coloração</b>	Azul de Coomassie R 250	250 mg
	Metanol	400 mL
	Agitar até dissolver	
	Ácido Acético glacial 99%	70 mL
	H <sub>2</sub> O destilada	até perfazer 1000 mL
<b>Solução de descoloração I</b>	Metanol	400 mL
	Ácido Acético glacial 99%	70 mL
	H <sub>2</sub> O destilada	até perfazer 1000 ml
<b>Solução de conservação II</b>	Metanol	50 mL
	Ácido Acético glacial 99%	70 mL
	H <sub>2</sub> O destilada	até perfazer 1000 mL