

XXXI Congresso da EAACI

Decorreu em Genebra, Suíça, de 16 a 20 de Junho, mais um congresso anual da Academia Europeia de Alergo-



logia e Imunologia Clínica (EAACI), subordinado ao tema “At the Crossroads of Research, Practice and Education”, que contou com mais de 6000 congressistas oriundos de mais de 100 países, e onde foram apresentados mais de 1700 trabalhos, contando com uma participação muito activa de vários colegas portugueses.

Referem-se a seguir os colegas portugueses que tiveram a seu cargo palestras em simpósios ou workshops, pela ordem cronológica por que foram realizadas:

- Rodrigo Rodrigues Alves, com o tema “Recurrent angioedema in clinical practice” no simpósio científico dos júnior membros “JMA Scientific Symposium – Bringing top science to JMA”;
- Eva Gomes, com o tema “How important is drug allergy in children?” no workshop 9 “Drug allergy in children and adult”;
- Luís Delgado, com o tema “Immunotherapy for ocular symptoms” no workshop 19 “Ocular allergy in practice”;
- André Moreira, com o tema “Obesity and asthma” no workshop 21 “Lifestyle and asthma: an EAACI Task Force consensus”.

Foram moderadores de sessões os colegas Alexandra Santos (simpósio científico dos júnior membros “JMA Scientific Symposium – Bringing top science to JMA” e

sessão de posters sobre “Epidemiology of childhood wheeze and asthma”), Ana Todo-Bom (sessão de apresentações orais subordinada

ao tema “Risk factors for asthma over a lifetime”), André Moreira (simpósio sobre “The immune response to physical exercise”), Carlos Nunes (simpósio sobre “Food allergies: opportunities and challenges from clinical practice to patient management”), Luís Delgado (curso de pós-graduação sobre “Accurate diagnosis and treatment of ocular allergy”), simpósio sobre “Stress and obesity as promoters of allergy”, sessão de apresentações orais subordinada ao tema “Allergic rhinitis and asthma” e sessão de posters sobre “From clinical assessment to improved education in asthma”), Luís Miguel Borrego (sessão de posters sobre “Childhood wheeze and asthma”), Mariana Couto (sessão educacional dos júnior membros “JMA Educational Session – Successful manuscript and grant writing”), Mário Morais de Almeida (simpósio sobre “Clinical Science Update – Focusing on your patient”) e Rodrigo Rodrigues Alves (sessão de posters sobre “IgE testing for food allergy”).

Por último referem-se os 11 trabalhos e respectivos autores que foram premiados neste congresso anual da EAACI:

- Mariana Couto, Palmares C, Beltrão M, Neves S, Morais A, Delgado L – “**Integrin α E β 7 (CD 103) expression in bronchoalveolar lymphocytes of hypersensitivity pneumonitis’ patients**” (“Oral Abstract Session 4 – Role of infections in chronic inflammation”);



- Diana Silva, Arend E, Delgado L, Carvalho J, Moreira A – **“Exercise training does not increase the risk of upper respiratory tract infection in the elderly”** (“Poster Session 29 – Sports, allergy and asthma”);
- Marta Pereira Martins, Quaresma R, Elza T, Salgado M, Ferrão A, Didenko I, Ferreira F, Vinhas de Sousa A, Campos L, Inácio F – **“Factors associated with FeNO values in asthmatic patients”** (“Poster Session 30 – Comprehensive approaches in asthma management”);
- Lee W, Chatchatee P, Eugenia Carrilho, Logtens-de Graaff P, Szajewska H – **“Effect of growing up milk containing short-chain galactooligosaccharides/long-chain fructooligosaccharides and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the occurrence of infections in young children attending day care centers”** (“Poster Session 50 – Interactions between infections and allergy”);
- Renata Ramalho, Almeida J, Beltrão M, Pirraco A, Costa R, Sokhastka O, Guardão L, Palmares C, Guimarães J, Delgado L, Moreira A, Soares R – **“Substance p as a therapeutic target for the obese-asthma phenotype”** (“Poster Session 53 – Update on experimental in vivo models in allergy”);
- Isabel Carrapatoso, Bartolome B, Ribeiro F, Cunha R, Segorbe Luís A – **“Which allergens are involved in walnut allergy?”** (“Poster Session 10 – What can we learn from food allergy case reports?”);

- Diana Silva, Pereira A, Santos N, Placido J – **“Reasons for discontinuing allergen subcutaneous immunotherapy”** (“Poster Session 14 – Recent clinical trials in immunotherapy”);
- Leonor Viegas, Lopes A, Branco Ferreira M, Pereira Barbosa M – **“Patent blue anaphylaxis”** (“Poster Session 19 – Hypersensitivity to radiocontrast media and anaesthetic agents”);
- Mariana Couto, Silva D, Moreira A, Placido J – **“Utility and safety of conjunctival challenges with *Dermatophagoides pteronyssinus*: the experience of a centre”** (“Poster Session 60 – Sinusitis, nasal polyposis and ocular allergy”);
- Moscoso T, João Gaspar Marques, Martins P, Leiria Pinto P – **“Cow’s milk specific IgE determination in cow’s milk allergic children”** (“Poster Session 65 – IgE testing for food allergy”);
- Raquel Sousa, Duque L, Ribeiro H, Abreu I, Duarte A, Gomes C, Cruz A, Esteves da Silva J – **“Effects of two atmospheric pollutants (SO₂ and NO₂) on protein content and allergenic properties of *Acer negundo* L. pollen”** (“Poster Session 77 – New insights into the relationship between air pollution and allergies”).

A todos os colegas atrás citados deseja a RPIA dar os parabéns pelos trabalhos desenvolvidos, esperando que vários deles venham brevemente a ser objecto de publicação nas páginas desta vossa Revista.



Estágio no *Christian Doppler Laboratory for Allergy Diagnosis and Therapy*, Áustria

Durante o mês de Julho de 2010, a interna realizou um estágio no *Christian Doppler for Allergy Diagnosis and Therapy*. Este Laboratório, vulgarmente designado CD Labor, pertence ao Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Naturais da Universidade de Salzburgo e é coordenado pela Professora Fátima Ferreira. A escolha do CD Labor para realização do estágio prendeu-se com o interesse da interna pela Alergologia Molecular. As publicações dos membros do CD Labor sobre alérgenos recombinantes e sobre a possibilidade da aplicação de hipoalérgenos na prática clínica despertaram o interesse da interna, o que tornou este Laboratório a escolha óbvia para um estágio que lhe permitisse compreender melhor e colaborar em actividades desenvolvidas no âmbito da Alergologia Molecular.

São objetivos do CD Labor a produção recombinante de alérgenos para utilização no diagnóstico e terapêutica de doenças alérgicas, nomeadamente a caracterização estrutural e imunológica de alérgenos de várias fontes alérgicas, desenvolvimento de métodos para produção, selecção e construção de sistemas de expressão de alérgenos recombinantes adequados e optimização das condições de crescimento e estratégias de purificação para cada alérgeno. É também desenvolvido trabalho no âmbito da produção de moléculas alérgicas com baixa capacidade de ligação à IgE – hipoalérgenos, para fins terapêuticos.

ACTIVIDADES REALIZADAS

O estágio foi dividido em 4 semanas, tendo em cada semana estado sobre orientação de um colaborador dife-

rente e observado diferentes procedimentos. Durante a primeira semana, observou e colaborou na expressão, extracção e purificação de Bet v I recombinante. Esta proteína é expressa por bactérias da espécie *Escherichia coli* nas quais foi previamente inserido um plasmídeo que codifica para o alérgeno recombinante. Após incubação e expressão da produção do alérgeno recombinante, procede-se à eletroforese do sobrenadante do meio de cultura em gel de poliacrilamida – SDS, técnica vulgarmente designada por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Poly-*



Acrylamide Gel Electrophoresis), para verificar a presença do alergénio pretendido. Esta técnica permite separar proteínas de acordo com a sua massa molecular. O SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*), reduz as proteínas à sua estrutura primária (linear) e confere-lhes carga negativa, permitindo que a velocidade de migração para o pólo positivo através do gel de poliacrilamida dependa apenas da massa molecular das mesmas. Tem enorme relevância nos processos de produção, extracção e purificação de alergénios recombinantes uma vez que vai permitir, em múltiplas fases destes processos, verificar a presença do alergénio, assim como de outras proteínas não desejadas, para além de permitir estimar a concentração de proteína produzida. É uma técnica elementar da Biologia Molecular, repetidamente utilizada em múltiplos passos da expressão de alergénios recombinantes, e foi desempenhada integralmente neste estágio.

Após o processo de expressão, observou os procedimentos de extracção do alergénio da solução previamente obtida, na qual podem existir ainda componentes bacterianos, nomeadamente organelos e ADN. Realiza-se depois a purificação do alergénio. Este processo ocorre por cromatografia, uma técnica que permite a separação de componentes de uma mistura. Após diluição seriada numa fase aquosa móvel, habitualmente uma solução tampão, a solução atravessa uma fase estacionária sobre pressão, denominada coluna de eluição, na qual, de acordo com as suas características, ficam retidas as substâncias de interesse. A fixação à coluna pode ocorrer por tamanho ou carga iónica (*size-exclusion/ion-exchange chromatography*), alterando-se as características da fase estacionária consoante as características da substância que queremos isolar da mistura. As moléculas que se ligaram à coluna são posteriormente eluídas em pequenas fracções, armazenadas em tubos de ensaio numerados, alterando gradualmente as características da fase móvel que então percorre a coluna (variação de pH, aumento da concentração iónica, ...). Quando abandonam o sistema, as substâncias em solução passam através de uma unidade de detecção, sendo medida a absorção UV, para além de outras características físicas (pH, condutância),

que vão permitir identificar a proteína que se deseja isolar. A identificação também é facilitada pela realização prévia do SDS-PAGE, que permite saber sobre a existência de outras proteínas e, se decorrer como esperado, porque a proteína desejada é a que se encontra em maior quantidade. Por vezes pode ser necessário utilizar mais que uma coluna de eluição no procedimento; outras vezes, por impossibilidade de obter uma coluna com as características que permitem a retenção das substâncias de interesse, pode ser necessário fazer eluição das "impurezas", aproveitando a solução que passa inicialmente através da coluna (*flow-through*), já sem as impurezas que foram captadas. Esta variação foi observada durante o procedimento de extracção do alergénio Art v 6 do pólen de artemísia e na primeira eluição dos hipoalergénios.

Após término da eluição, é realizado SDS-PAGE das fracções onde se suspeita que esteja a proteína de interesse, assim como de fracções onde é pouco provável que a proteína esteja presente. Desta forma é possível confirmar que a maior concentração de proteína se encontra nos tubos que correspondem aos picos de absorção UV e que não existe proteína de interesse nas fracções que, tendo em conta os registos das características do eluído, serão para rejeitar. Após escolha das fracções de interesse, e se o processo de purificação estiver terminado, são armazenados *aliquots* das fracções, posteriormente conservados a temperaturas negativas.

No final da primeira semana observou a realização de lavado bronco-alveolar (LBA) em ratinhos. Após sacrifício animal por tracção da coluna cervical, procedeu-se à dissecação dos tecidos cervicais anteriores, com exposição da traqueia. Através de um orifício na traqueia, foi instilada com agulha e seringa uma solução salina nos pulmões, aspirada de seguida. A instilação pulmonar seguida de aspiração foi realizada 3 vezes em cada animal e este procedimento foi realizado em 4 animais. Posteriormente, o LBA foi submetido a citometria de fluxo, com marcação para CD45 (antigénio comum dos leucócitos) e GR-1 (antigénio de diferenciação mielóide, presente em granulócitos maduros na medula óssea e tecidos).



Após colheita do LBA, procedeu-se à recolha de células dendríticas. Na câmara de manipulação celular, em ambiente estéril, foram dissecados os tecidos dos membros inferiores, com exteriorização dos fémures. As extremidades superiores e inferiores deste osso longo foram cortadas e uma agulha introduzida na medula óssea, com colheita do seu conteúdo e colocação em frascos de cultura celular, posteriormente armazenados numa estufa a 36°C.

Na segunda semana esteve sob orientação de Gabriele Gadermaier, que está responsável pela investigação dos alergénios do grupo das nsLTPs (*non-specific lipid transfer proteins*). Observou e colaborou na expressão de Art v 3, nsLTP da artemísia. Colaborou também na realização de ensaios ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) para avaliar características das nsLTPs. O primeiro ensaio de ELISA observado tinha como objectivo avaliar a reactividade cruzada entre 3 nsLTPs (Pru p 3 do pêssêgo, Api g 2 do aipo e Art v 3 da artemísia). Os poços foram recobertos com as nsLTPs e posteriormente incubados com soro murino de 3 ratos sensibilizados a nsLTPs. Observou e colaborou num ensaio ELISA com o objectivo de determinar se um anticorpo murino anti-Art v 3 era capaz de prevenir a ligação de IgE humana a este alergénio.

Na terceira semana de estágio esteve sob orientação de Anargyros Roulias e participou activamente na expressão de hipoalergénios, nomeadamente Mal K I e Cor K I,

moléculas hipoalergénicas dos alergénios *major* da maçã (Mal d I) e da avelã (Cor a I). Estas moléculas foram modificadas por mutação, alterando no ADN que codifica o alergénio recombinante os codões que codificam o aminoácido leucina, por codões que codificam o aminoácido lisina (designado na nomenclatura internacional pela letra K). Esta alteração na cadeia de aminoácidos tem como objectivo prevenir a criação de pontes de hidrogénio, tornando a proteína linear. Tendo em conta que os epítomos de ligação à IgE se localizam habitualmente em sulcos dependentes da estrutura tridimensional dos alergénios, a linearização da proteína vai alterar a capacidade de ligação da IgE ao alergénio. Quando se procede à alteração da cadeia de aminoácidos por substituição, a nomenclatura do alergénio é alterada, sendo substituída a letra inicial do segundo nome que designa a espécie pela letra que codifica o aminoácido inserido na proteína mutada. Assim, a molécula hipoalergénica do alergénio *major* da maçã, Mal d I, obtida por substituição dos resíduos de leucina por lisina (K), passa a designar-se Mal K I.

A expressão de hipoalergénios ocorre, na generalidade, de forma semelhante aos restantes alergénios recombinantes. No entanto, apresenta algumas especificidades decorrentes do facto de as proteínas na sua forma linear não serem solúveis. Para permitir que estas se mantenham lineares, as soluções necessitam ser mantidas a temperaturas baixas, o que obriga ao armazenamento constante da proteína no frigorífico, mesmo por curtos períodos de tempo entre operações. Para além da necessidade de baixas temperaturas, para que as proteínas se mantenham lineares durante a cromatografia, são utilizadas soluções tampão com altas concentrações de ureia.

Na quarta semana, sob orientação de Michael Hauser e Martin Wolf, para além dos procedimentos de extracção e purificação dos alergénios do pólen de artemísia, observou e colaborou na realização de técnicas de *immunoblotting* com alergénios do pólen de bétula e com os alergénios *major* da família *Cupressaceae*, para além de ter observado a realização de RAST (*radioallergosorbent test*). Os ensaios de *immunoblotting* permitem verificar, e quantificar, a pre-

sença de anticorpos para uma determinada fracção proteica. Após realização de SDS-PAGE do marcador e alérgénio pretendido, habitualmente em múltiplos poços para que se possam testar vários soros no mesmo ensaio, e sem se proceder à sua coloração, é levada a cabo a transferência dos alérgénios do gel para uma membrana de nitrocelulose, que apresenta alta afinidade para proteínas. Após transferência proteica, a membrana de nitrocelulose é removida e colocada numa placa de Petri. Nos procedimentos em que se pretende avaliar a reactividade de alérgénios de uma única fonte alérgénica com soros de diversos doentes, a membrana de nitrocelulose é cortada em colunas que correspondem aos locais de migração das proteínas de cada um dos poços do SDS-PAGE, para que em cada coluna constem todas as proteínas submetidas a eletroforese, em bandas a diferentes alturas, correspondendo a diferentes massas moleculares. Procedem-se depois à incubação das colunas de nitrocelulose com o soro, para que as imunoglobulinas existentes no mesmo se liguem aos alérgénios, com lavagem posterior para eliminação das imunoglobulinas não ligadas. A quantificação do anticorpo ligado ao alérgénio pode realizar-se qualitativamente, através de uma reacção enzimática colorimétrica, utilizando fosfatase alcalina, semelhante à previamente descrita para o método ELISA, ou quantitativamente, por RAST. Este método, apesar de ser moroso, envolver os riscos de manipulação de material radioactivo e exigir a existência de uma câmara gama para leitura dos resultados, é um teste pouco dispendioso e permanece como *gold-standard* na quantificação da IgE específica para um alérgénio, devido às suas elevadas sensibilidade e especificidade, sendo ainda utilizado em investigação.

Na última semana observou também ensaios com células RBL (*rat basophil leukemia cells*). Estas células foram previamente “humanizadas” (huRBL), através da introdução de receptores FcεRI humanos nestes basófilos com elevada capacidade replicativa. Estes receptores de alta afinidade iniciam a transdução de sinal responsável pela desgranulação dos basófilos quando estimulados pela ligação do alérgénio à IgE a que se encontram ligados, com libertação

de múltiplos mediadores, nomeadamente histamina e β-hexoaminidase, uma enzima lisossomal capaz de catalisar reacções que induzem fluorescência de substratos como a resorcina. Ensaios com huRBL permitem inferir sobre a capacidade de resposta *in vivo* de determinados doentes (utilizando o seu soro para fornecer a IgE aos basófilos) a determinado alérgénio em diferentes concentrações. RBLs previamente cultivadas são incubadas em poços de placas de ELISA com o soro de doentes, neste caso sensibilizados a Bet v I. Após lavagem, procede-se à introdução do alérgénio, a Bet v I sintetizada na primeira semana de estágio, em diversos poços a diferentes concentrações. Este ensaio permitiu verificar que o alérgénio Bet v I produzido no CD Labor apresenta actividade biológica, induzindo desgranulação de huRBLs na presença de IgE de indivíduos sensibilizados a este alérgénio.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após um período inicial de alguma desconfiança, a maioria dos elementos do Laboratório partilhou conhecimentos e os projectos em que estavam envolvidos. No entanto, tendo em conta a investigação levada a cabo no CD Labor, foi solicitado à interna que os procedimentos e resultados que observou não fossem revelados publicamente por um período de 12 a 18 meses, para que as linhas de investigação do Laboratório não fossem precocemente reveladas.

Quanto às actividades desenvolvidas no Laboratório, a sua observação permitiu à interna uma maior compreensão dos mecanismos básicos da Biologia Molecular aplicados à Alergologia, assim como as dificuldades técnicas e desafios inerentes aos processos de investigação e à transição dos produtos que daí advêm para uma futura utilização clínica.

Ana Reis Ferreira

Interna de Imunoalergologia
Centro Hospitalar de São João, Porto