



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Purificação e Caracterização de uma Protease do Pólen de *Chenopodium sp.*

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Paula Veríssimo (Universidade de Coimbra).

Denis Manuel de Castro Brito

2013

Agradecimentos

À Professora Doutora Paula Veríssimo, pela orientação científica, apoio e disponibilidade ao longo deste projecto. Foi realmente um privilégio ter partilhado o seu conhecimento.

Ao Professor Doutor Euclides Pires, pela oportunidade e pela disponibilização de todos os meios necessários para trabalhar no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

À Isabel Nunes, por toda a disponibilidade e ajuda na parte celular.

A todas as pessoas que fazem parte do Laboratório de Biotecnologia Molecular, especialmente à Sara, à Sofia, ao Bruno e à Ana, pela ajuda e por todos os bons momentos passados na vossa companhia. Nunca pensei que “colegas de trabalho” pudessem vir a ser tão bons amigos.

A todos os meus amigos, especialmente ao Codêso, ao Pedro, ao Carlos, ao Paulo, à Claudinha, à Ana Cristina, à Mariana, ao André e ao Luís Miguel, por todos os momentos que passamos juntos e que, espero continuarmos a passar.

A ti Sara...um obrigado por tudo...

Ao meu mano Filipe, por estares sempre *presente* apesar da distância que nos separa.

E, finalmente, aos meus pais, pelo apoio incondicional ao longo de todos estes anos. Sem vocês nada disto seria possível. Je vous aime beaucoup...

Índice

Abreviaturas	VII
Resumo	IX
Abstract	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Alergia a Pólenes	3
1.1.1 Alergia a <i>Chenopodium sp</i>	5
1.2 Doenças Alérgicas.....	6
1.2.1 Hipersensibilidade do Tipo I	6
1.2.2 Rinite Alérgica	11
1.2.3 Asma Alérgica	12
1.3 Epitélio Pulmonar	13
1.3.1 Remoção Mucociliar	13
1.3.2 Modulação da Actividade de Células Inflamatórias	13
1.3.3 Actividade contra Proteases	14
1.3.4 Barreira Epitelial	14
1.4 Actividade Proteolítica em Material Alergénico	17
1.4.1 Ácaros	18
1.4.2 Fungos	21
1.4.3 Baratas	22
1.4.4 Pólenes	23
1.4.5 Papel das Proteases na Sensibilização Alérgica – Mecanismo Geral	26
1.5 Objectivos do Trabalho	29
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 Extracto Polínico de <i>Chenopodium sp</i>	33
2.2 Purificação de uma Protease Presente no Pólen de <i>Chenopodium sp</i>	33

2.2.1	Cromatografia de Exclusão Molecular.....	33
2.2.2	Cromatografia de Troca Iónica	34
2.2.3	Cromatografia de Afinidade	34
2.3	Quantificação de Proteína.	34
2.4	Electroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS.....	35
2.5	Coloração com <i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	35
2.6	Coloração com Nitrato de Prata.....	35
2.7	Electroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Nativas	36
2.8	Caracterização Enzimática da Protease Purificada	36
2.8.1	Ensaio Enzimáticos	36
2.8.2	Ensaio de Inibição Enzimática	37
2.9	Cultura e Manutenção de Células Calu-3 e MDCK	38
2.10	Medição da Permeabilidade Transepitelial.....	39
2.11	Preparação de Extractos Celulares.....	40
2.12	Imunodeteção.....	41
2.13	Análise Estatística dos Resultados.....	42
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1	Purificação de uma Protease Presente no Pólen de <i>Chenopodium</i> sp.....	45
3.2	Caracterização Enzimática da Protease Purificada.....	53
3.3	Efeito da Protease Purificada na Integridade de Células Epiteliais.....	59
3.3.1	Permeabilidade Transepitelial	59
3.3.2	Degradação de Proteínas das Junções Intercelulares	62
4.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	67
	Referências Bibliográficas	71

Abreviaturas

AEBSF	Fluoreto de 4-(2-aminoetil)-benzenosulfonilo
AJ	Junções aderentes
APC	Célula apresentadora de antigénio
COX	Ciclooxygenase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTT	Ditiotreitol
E-64	Trans-epoxisuccinil-L-leucinamino(4-guanidino)butano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Factor de crescimento epitelial
Ei	Extracto inicial
FcεR	Receptor de ligação a IgE
FPLC	Cromatografia líquida a pressão moderada
GJ	Junções comunicantes
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN- γ	Interferão do tipo γ
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
JAM	Molécula de adesão juncional
MCA	<i>4-Methyl-Coumaryl-7-Amide</i>
MDCK	Linha celular Madin-Darby <i>Canine Kidney</i>
MHC	Complexo major de histocompatibilidade
Mist Arg	Mistura de arginina sepharose
Mist EM	Mistura de exclusão molecuclar
Mist TIQ	Mistura de troca iónica
MMP	Metaloprotease da matriz
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PAR	Receptor activado por proteases
PBS	Solução salina tamponizada com fosfato
PG	Prostaglandina
pI	Ponto isoeléctrico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
RITC-Dex 70S	Dextrano de 70 kDa associado a isotiocianato de rodamina B
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SLPI	Inibidor de leucoprotease secretora
SP	Substância P
TBS-T	Solução salina tamponizada com Tris contendo Tween 20
TGF- β	Factor de crescimento tumoral do tipo β
Th	Linfócitos-T auxiliares
TJ	Junções de oclusão
TLCK	<i>N-α-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone</i>
TPCK	<i>L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone</i>
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
VEGF	Factor de crescimento endotelial vascular
VIP	Peptídeo intestinal vasoactivo
ZAK	Cinase associada a Zonula Occludens-1
ZO	<i>Zonula occludens</i>
ZONAB	Proteínas de ligação ao ácido nucleico associado à Zonula Occludens-1
α 1-PI	α 1-inibidor de protease ou α 1-antitripsina

Resumo

Os pólenes de plantas anemófilas são importantes indutores de doenças alérgicas, como a asma e a rinite. O pólen quando é hidratado, para além de libertar uma diversidade de alérgenos, liberta também proteases. Estas podem desempenhar um papel relevante na sensibilização alérgica, uma vez que levam à fragilização da barreira epitelial, potenciando o contacto entre os alérgenos e células do sistema imunitário. Podem também activar receptores específicos de proteases, que levam, por sua vez, a uma resposta inflamatória através da libertação de citocinas pró-inflamatórias e do recrutamento de células Th2. Para além disso, as proteases são capazes de clivar moléculas envolvidas na regulação da homeostase pulmonar, o que potencia ainda mais o desenvolvimento de reacções inflamatórias.

Vários estudos têm demonstrado que a presença de actividade proteolítica em materiais alérgicos é responsável por potenciar a resposta alérgica. No entanto, poucos são os estudos em pólenes que se focam em purificar e caracterizar as proteases possivelmente responsáveis pelos mecanismos inerentes à sensibilização alérgica. Consequentemente, surge a necessidade de efectuar este tipo de estudo, de modo a poder encontrar possíveis alvos terapêuticos e tentar reduzir o impacto das doenças alérgicas.

O pólen da planta *Chenopodium sp.* possui uma alergenicidade moderada e encontra-se bastante disseminado pela zona mediterrânica. Estudos anteriores conseguiram demonstrar a presença de proteases neste pólen, responsáveis pelo aumento da permeabilidade numa linha celular do epitélio humano (Gaspar, R., 2012). Neste trabalho procedeu-se à purificação da protease maioritariamente responsável por essa actividade, utilizando uma série de processos cromatográficos sequenciais: exclusão molecular, troca iónica e afinidade. Este processo de purificação permitiu isolar parcialmente uma protease de cerca de 60 kDa e de baixo pI. Posteriormente, a protease purificada foi caracterizada através de ensaios de inibição com vários inibidores para as diversas classes proteolíticas conhecidas. O perfil de inibição obtido apresenta maior semelhança com metaloaminopeptidases. Para além disso, este perfil

é semelhante ao obtido anteriormente para o extracto polínico de *Chenopodium sp.*, o que pode indicar que a protease purificada é a principal responsável pela actividade enzimática obtida nesse extracto.

Com o objectivo de avaliar o efeito da protease purificada na integridade da barreira epitelial recorreu-se às linhas celulares epiteliais células Calu-3 e MDCK. As células Calu-3 foram utilizadas para ensaios de permeabilidade transepitelial, enquanto que as MDCK foram utilizadas para estudos da degradação dos complexos proteicos intercelulares. A protease purificada não conseguiu induzir nenhum aumento da permeabilidade transepitelial, nem degradar proteínas das junções de oclusão, nomeadamente Claudina-1 e Ocludina. Por outro lado o extracto polínico de *Chenopodium sp.* continuou a exercer um aumento da permeabilidade transepitelial, resultante da disrupção de proteínas constituintes das junções de oclusão. Esta disrupção foi inibida parcialmente na presença de um inibidor de proteases, o que indica que estas enzimas interferem de facto com a integridade da barreira epitelial.

Palavras chave: pólenes; *Chenopodium sp.*; proteases; purificação; caracterização; permeabilidade transepitelial; junções intercelulares.

Abstract

Anemophilous plants are important inductors of allergic disorders, like asthma and rhinitis. The hydration of the pollen grain leads to the release of a diversity of allergens but also proteases. These proteases may play an important role in allergic sensitization, leading to epithelium barrier breakdown, which allows allergens to contact cells of the immune system. They can also stimulate protease-activated receptors, leading to an inflammatory response, due to the release of pro-inflammatory cytokines and Th2 cell recruitment. Furthermore, proteases can cleave molecules involved in pulmonary homeostasis, which further enhances the development of inflammatory reactions.

Several studies have demonstrated that protease activity in allergenic materials is responsible for enhancing the allergic response. However, there are few studies that focus on purifying and characterizing proteases that could be responsible for mechanisms of allergic sensitization. Thus, there is a great need to carry out such studies in order to find out potential therapeutic targets and try to reduce the impact of allergic diseases.

Chenopodium sp. pollen has a moderate allergenicity and is quite widespread over the Mediterranean area. Previous studies have demonstrated the presence of pollen proteases, responsible for the increased permeability in a human epithelial cell line (Gaspar, R., 2012). In this study, we proceeded to purify the protease mostly responsible for this activity using series of sequential chromatographic processes: molecular exclusion, ion exchange and affinity. This purification process allowed the partial isolation of a 60 kDa protease with low pI. After that, the purified protease was characterized by inhibition assays with inhibitors for the various proteolytic classes known. The inhibition profile obtained shows greater similarities with metalloaminopeptidases. Beside that, this profile is similar to the previously obtained for *Chenopodium sp.* pollen extract, which may indicate that the purified protease is primarily responsible for the proteolytic activity of this extract.

In order to evaluate the effect of purified protease in epithelial barrier integrity we used Calu-3 and MDCK epithelial cell lines. Calu-3 cells were used for transepithelial permeability assays, whereas MDCK were used to study disruption of intercellular protein complexes. The purified protease failed to induce an increase of transepithelial permeability, and to degrade tight junction proteins, namely Claudin-1 and Occludin. On the other hand, *Chenopodium sp.* pollen extract continued to increase transepithelial permeability, resulting from disruption of tight junctions proteins. This disruption was partially inhibited in the presence of a protease inhibitor, which indicates that these enzymes do interfere with the epithelial barrier integrity.

Keywords: pollens; *Chenopodium sp.*; proteases; purification; characterization; transepithelial permeability; intercellular junctions.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Alergia a Pólenes

Os pólenes têm sido comumente associados a doenças alérgicas, sendo um dos principais indutores aéreos das mesmas (10 a 20% dos casos na Europa) (D'Amato, G. & Liccardi, G., 1994), devido ao seu elevado conteúdo alérgico e disseminação generalizada.

Os grãos de pólen fazem parte do ciclo de vida de uma planta em flor, uma vez que constituem o gametófito masculino (desenvolvem-se dentro dos sacos das anteras) na reprodução sexuada de angiospérmicas e gimnospérmicas, sofrendo depois um processo de transferência para as estruturas reprodutoras femininas, processo este designado polinização. Esta pode ser conseguida por três vias: através do vento (anemófila), de insectos (entemófila) e/ou da água. Como a polinização anemófila é menos eficiente que a entemófila, as plantas anemófilas produzem elevadas quantidades de pólen de modo a assegurar o sucesso da fertilização, sendo este tipo de pólen o mais abundante na atmosfera e o mais importante sob o ponto de vista de exposição humana (Burge, H. A. & Rogers, C. A., 2000).

Morfologicamente, os grãos de pólen são estruturas multinucleadas, aproximadamente esféricas, de diâmetro reduzido e possuem uma parede celular rígida de dupla camada. A camada externa (exina) é composta por esporopolenina e é essencial para a resistência do pólen a altas temperaturas e a uma larga gama de valores de pH; a camada interna (intina) é composta por pectocelulose e envolve o citoplasma do pólen (Figura 1).

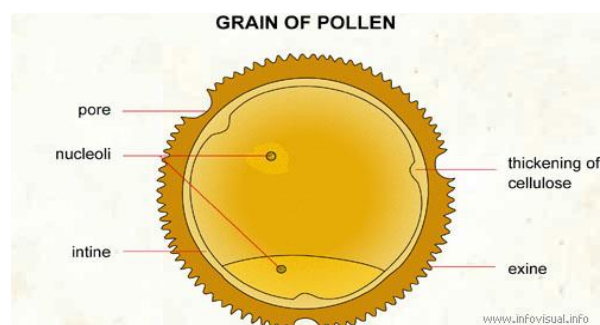


Figura 1 – Morfologia de um grão de pólen (retirado de www.infovisual.info).

Os alergénios do pólen localizam-se então no interior dos grãos de pólen, associados aos organelos presentes no citoplasma pelo que é necessário que haja libertação dos alergénios para ocorrer sensibilização em indivíduos pré-dispostos (Cortes, L., 2006). Os grãos de pólen maduros são parcialmente desidratados quando são dispersos a partir das anteras (Traidl-Hoffmann, C. *et al*, 2002); no entanto, quando são inalados, sofrem um processo de hidratação que leva à libertação de uma grande variedade de alergénios, tipicamente proteínas hidrossolúveis ou glicoproteínas de peso molecular entre 10-70 kDa, e de outras proteínas, como proteases e NADPH oxidases (Thompson, P.J. 1998; Vinhas, R. *et al*, 2011).

Os alergénios podem também estar presentes noutras estruturas das plantas, como as raízes, os estames, as folhas, as sementes e/ou os frutos, como acontece nos casos de *Ambrosia spp.*, *Plantago spp.* e em vários tipos de ervas de pasto. A alergia pode ainda ser originada por substâncias libertadas pela planta, como é o caso do milho, do algodoeiro e de algumas herbáceas (Grote, M. *et al*, 1988; van Ree, R. *et al*, 1992).

Um mecanismo importante na indução da reacção alérgica é a reactividade cruzada, que pode ocorrer devido ao facto de proteínas antigénicas distintas poderem exibir uma certa semelhança na sua sequência de aminoácidos, o que leva a reacções cruzadas entre diferentes alergénios e um mesmo anticorpo específico. Por exemplo, os principais alergénios polínicos de plantas que coexistem em zonas climáticas temperadas são estrutural e imunologicamente similares, sendo que os níveis de similaridade chegam a atingir os 90% em espécies do mesmo género (Matthiesen, F. *et al*, 1991).

A alergia ao pólen tem impacto em toda a Europa e tem vindo a aumentar com uma tendência evidente na zona mediterrânea (D'Amato *et al*, 1994). Como o conteúdo alergénico da atmosfera varia de acordo com o clima, geografia e vegetação, através de dados de prevalência de pólenes obtidos de estudos aerobiológicos e alergológicos, é possível construir calendários de polinização das plantas de uma determinada área amostral.

1.1.1 Alergia a *Chenopodium sp.*

Chenopodium sp. é uma planta perenial que pertence à família Chenopodiaceae (Figura 2) (Pauli, G., 2000). Esta planta encontra-se em todo o mundo, sobretudo nas regiões temperadas da Europa, África, Ásia, América e Austrália, e cresce em todos os tipos de solos (Valenta, R., 2007). O pólen *Chenopodium sp* reproduz-se principalmente por polinização anemófila e caracteriza-se por possuir grãos de pólen de forma esférica ou ovoide e com dimensão pequena a média (10-28 μm), uma alergenicidade moderada e um período de polinização entre Abril e Outubro (Rede Portuguesa de Aerobiologia – www.rpaerobiologia.com).

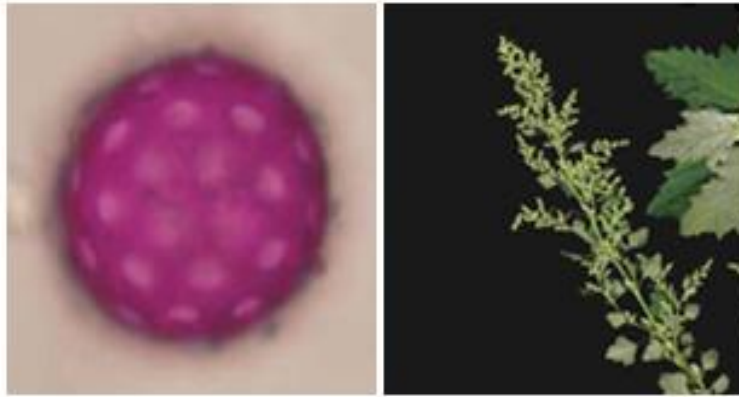


Figura 2 – Imagem do grão de pólen (esquerda) e da planta em flor de *Chenopodium sp.* (direita) (adaptado de Rede Portuguesa de Aerobiologia – www.rpaerobiologia.com).

Três alergénios de *Chenopodium sp.* foram já identificados e caracterizados, nomeadamente Che a 1, Che a 2 e Che a 3. O Che a 1 é considerado o principal alergénio deste pólen, sendo uma glicoproteína com peso molecular de 17 kDa e composta por 143 resíduos aminoácidos, reconhecida em mais de 77% dos pacientes alérgicos a *Chenopodium sp.* A sequência deste alergénio exhibe 27-45% de similaridade com outros alergénios bem conhecidos da família de proteínas tipo Ole e 1 (Barderas, R. *et al*, 2002); no entanto, foi detectada pouca reactividade cruzada entre os alergénios Che a 1 e Ole a1 (Gadermaier, G. *et al*, 2004). A Che a 2 é uma proteína ubíqua de 14,5 kDa, pertencente à família das profilinas (proteínas que ligam actina) e está envolvida em processos de transdução de sinal, podendo ser encontrada como

um pan-alergénio de reactividade cruzada em quase todas as espécies de plantas. Por sua vez, a Che a 3 é uma proteína de 9,5 kDa, pertencente à família das polcacinas (proteínas que ligam cálcio), sendo também um pan-alergénio de reactividade cruzada amplamente distribuído na natureza. Pacientes alérgicos a *Chenopodium album* (ansarina-branca), espécie mais comum na Europa, apresentam 55% e 46% de reactividade a Che a 2 e Che a 3, respectivamente (Nouri, H.R. *et al*, 2011). Para além disso, estes dois alergénios são importantes neste pólen uma vez que estão envolvidos na reactividade cruzada com outros alergénios, o que explica a polisensibilização muito frequente de pacientes alérgicos a *Chenopodium spp*. Rodriguez e seus colaboradores comprovaram que ambos estes alergénios apresentam elevada reactividade cruzada com as correspondentes profilina e polcacina de oliveira, devido às suas sequências conservadas de aminoácidos (Rodriguez, R. *et al*, 2002).

1.2 Doenças Alérgicas

Deficiências no funcionamento do sistema imunitário estão na origem de várias doenças. Um exemplo disso são as doenças alérgicas, que resultam de uma reacção excessiva do sistema imunitário (hipersensibilidade) a agentes estranhos inócuos ou aos próprios constituintes do organismo, sendo que dentro destas doenças encontramos a rinite alérgica, a asma alérgica, a conjuntivite alérgica, a urticária, a dermatite atópica e a anafilaxia, entre outros.

As doenças alérgicas têm vindo a aumentar nas últimas décadas, sendo que, actualmente na Europa, cerca de 10 a 15% da população sofre de rinite alérgica e 8 a 10% da população sofre de asma (Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica – www.spaic.pt).

1.2.1 Hipersensibilidade do Tipo I

As alergias são reacções de hipersensibilidade imediata a certos antigénios ambientais, designados alergénios, mais concretamente uma hipersensibilidade do tipo I ou atopia que se caracteriza por uma tendência pessoal ou familiar do indivíduo

em ficar sensibilizado e produzir excessivamente imunoglobulina E (IgE) em resposta a um alérgico ambiental comum (Kay, A.B., 2001).

Num primeiro contacto com o alérgico, os linfócitos B são estimulados a diferenciarem-se em plasmócitos que produzem anticorpos específicos da classe IgE que vão ligar-se a mastócitos tecidulares e a basófilos sanguíneos. Num segundo contacto, o alérgico liga-se aos anticorpos IgE presentes na superfície dos mastócitos e basófilos e estimula estas células a libertar grandes quantidades de mediadores farmacologicamente activos, nomeadamente histamina, o que vai desencadear uma reacção inflamatória intensa que é responsável pelos sintomas da alergia, como, por exemplo, espirros, erupções cutâneas e contracção dos músculos das vias respiratórias. Algumas reacções alérgicas podem mesmo conduzir a um choque anafilático, que é provocado pela diminuição brusca da pressão arterial em consequência do aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos (Abbas, A.K. *et al*, 2007).

A produção de IgE específico inicia-se quando o alérgico é fagocitado e processado proteoliticamente por células apresentadoras de antígeno (APCs- *Antigen-presenting Cells*), nomeadamente células dendríticas, no sistema respiratório. Depois desse processamento, um segmento peptídico do alérgico (determinante antigénico) é exposto à superfície das APCs em associação com o complexo major de histocompatibilidade (MHC) classe II. De seguida, as APCs sofrem um processo de maturação, migrando para nódulos linfáticos regionais. O complexo MHC-peptídeo é reconhecido de forma específica por receptores à superfície dos linfócitos T auxiliares (Th, T – *helper*), o que leva à diferenciação destas células para um estado activado (Figura 3). Os linfócitos Th podem então diferenciar-se em linfócitos Th tipo 1 (Th1) ou em linfócitos Th tipo 2 (Th2); os primeiros produzem interleucina (IL)-2, interferão (IFN)- γ e factor de necrose tumoral (TNF)- α/β , regulando negativamente a síntese de IgE; os segundos produzem IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, estimulando a síntese de IgE pelos linfócitos B e promovendo a diferenciação de mastócitos e eosinófilos. Consequentemente, as respostas inflamatórias são dominadas pelos efeitos de um dos tipos de linfócitos Th em detrimento do outro; por exemplo, no caso da hipersensibilidade tipo I há um efeito dominante dos linfócitos Th2. Assim sendo, a

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

maioria das características das doenças alérgicas atópicas, especialmente a síntese de IgE, resultam do efeito combinado das citocinas libertadas pelos linfócitos Th2. Vários estudos experimentais confirmaram a importância dos linfócitos Th2 nas reacções de hipersensibilidade imediata: experiências nas quais ratinhos inalaram um antígeno proteico modelo, tal como albumina do ovo de galinha, e foram injectados com linfócitos T específicos para esse antígeno, mostraram que a transferência de linfócitos Th2 induziu uma hiperresposta respiratória semelhante à asma; no mesmo modelo animal, o bloqueio das respostas Th2 reduziu a severidade da reacção alérgica. Noutro estudo, ratinhos *knockout* para T-bet, um factor de transcrição de Th1, mostraram respostas Th1 deficientes e um aumento compensatório das respostas Th2, sendo que estes ratinhos desenvolveram reacções alérgicas espontâneas nas vias respiratórias (Abbas, A.K. *et al*, 2007).

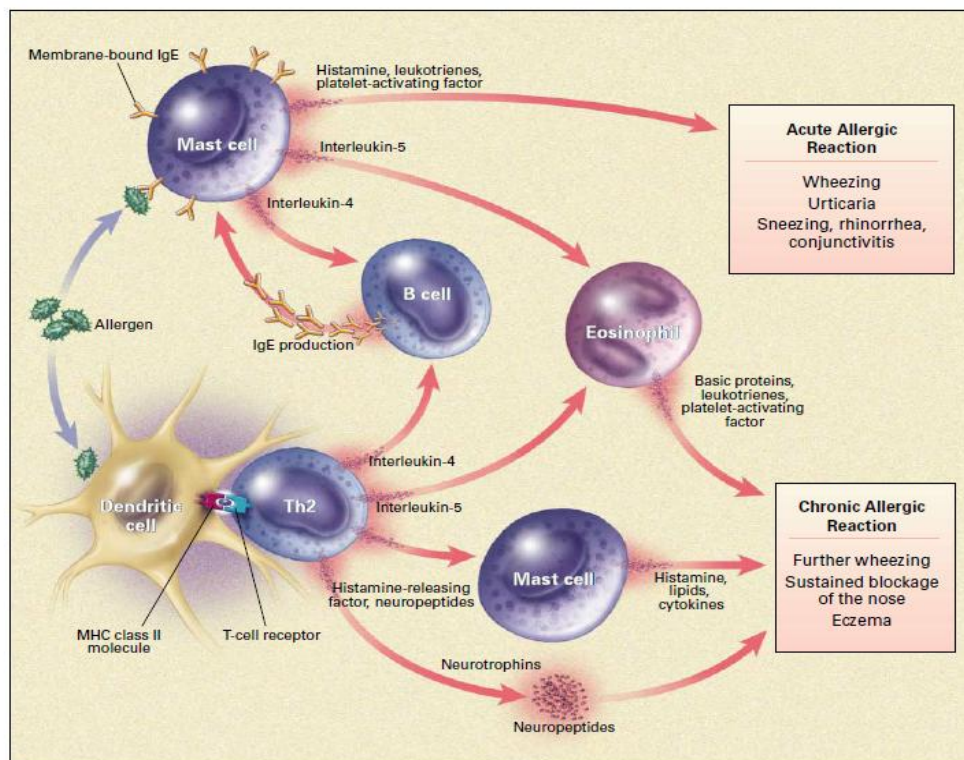


Figura 3 – Vias que levam à reacção alérgica. IgE produzida por linfócitos B liga a receptores específicos existentes à superfície de mastócitos e eosinófilos, despoletando a reacção alérgica imediata. A ligação do antígeno a células dendríticas estimula a libertação de uma variedade de moléculas de linfócitos T que são responsáveis pelo desenvolvimento da resposta alérgica e inflamatória (adaptado de Kay, A.B. 2001).

Os linfócitos B específicos para alérgenos são então ativados por linfócitos Th2, uma vez que sob a influência do ligando CD40 e citocinas, principalmente IL-4, os linfócitos B sofrem uma troca da cadeia pesada e produzem IgE. Esta circula como um anticorpo bivalente e está normalmente presente no plasma numa concentração inferior a 1 ug/ml; em condições patológicas, como atopia severa, o nível de IgE pode ultrapassar os 1000 ug/ml. Apesar de ser produzida exclusivamente pelos linfócitos B, a IgE funciona como um receptor de antígenos na superfície de várias células envolvidas na hipersensibilidade imediata, como mastócitos e basófilos, fazendo com que essas células fiquem sensibilizadas e reajam a um subsequente encontro com o alérgeno. Esta função é conseguida pela ligação da IgE a um receptor Fc de elevada afinidade ($K_d = 10^{-10}$ M) e específico para cadeias pesadas ϵ , designado Fc ϵ RI. Em todos os indivíduos, os mastócitos tecidulares encontram-se normalmente revestidos com IgE, a qual está ligada a Fc ϵ RI. Em indivíduos atópicos, uma quantidade suficiente desta IgE ligada é específica para um ou mais antígenos de tal modo que a exposição a esse ou esses antígenos é capaz de estabelecer ligações cruzadas com os receptores Fc e activar as células. Cada molécula de Fc ϵ RI é tetramérica, composta por uma cadeia α , que medeia a ligação ao fragmento constante (Fc) do ligando IgE; uma cadeia β , que aumenta a estabilidade do receptor e a sua capacidade de sinalização; e duas cadeias γ idênticas, que são responsáveis pela propagação do sinal intracelular. O terminal amínico extracelular da cadeia α inclui dois domínios do tipo Ig que formam o local de ligação da IgE. Vários estudos demonstraram a importância dos receptores Fc ϵ RI nas reacções de hipersensibilidade imediata mediadas por IgE. Num desses estudos foram utilizados ratinhos *wild-type* e *knockout* para a cadeia α do Fc ϵ RI, aos quais foram dadas injeções intravenosas de IgE específica para um antígeno conhecido seguido desse mesmo antígeno, sendo que os ratinhos *knockout*, ao contrário dos *wild-type*, não desenvolveram anafilaxia (Abbas, A.K. *et al*, 2007).

Num indivíduo alérgico a um determinado antígeno, uma grande proporção da IgE ligada aos mastócitos é específica para esse antígeno, pelo que a exposição ao mesmo vai ligar de forma cruzada suficientes moléculas de IgE para iniciar a activação de mastócitos. Pelo contrário, em indivíduos não-atópicos, a IgE associada a mastócitos é específica para vários antígenos diferentes, os quais normalmente

induzem baixos níveis de produção de IgE; assim, nenhum antigénio em particular vai ligar de forma cruzada uma quantidade suficiente de moléculas de IgE para causar a activação de mastócitos (Abbas, A.K. *et al*, 2007).

A activação dos mastócitos e basófilos resulta em três tipos de resposta biológica: secreção de mediadores pré-formados dos grânulos secretores por um processo regulado de exocitose; síntese e secreção de mediadores lipídicos; e síntese e secreção de citocinas (Tabela I). Estas respostas resultam da ligação cruzada de IgE aos receptores FcεRI na superfície dos mastócitos e basófilos, a qual inicia uma cascata de sinalização envolvendo proteínas tirosina cinases (Abbas, A.K. *et al*, 2007).

Tabela I - Principais mediadores inflamatórios libertados por mastócitos, após a ligação cruzada de receptores FcεRI, e respectivas contribuições para a reacção alérgica imediata e/ou tardia (adaptado de Goldsby *et al.*, 2000).

MEDIADORES PRÉ-FORMADOS	
Histamina	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Aumento da permeabilidade vascular ✓ Broncoconstricção ✓ Produção de muco ✓ Estímulo de linfócitos-T supressores
Heparina	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Aumento da migração de células endoteliais ✓ Regulação da actividade da triptase, quimase e elastase dos neutrófilos
Factores Quimiotactéis	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Recrutamento de eosinófilos e neutrófilos
Triptase	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Activação de componentes do sistema complemento, responsáveis pela desgranulação de mais mastócitos ✓ Activação de receptores PAR-2 (<i>Protease Activated Receptores</i>) a nível do endotélio e epitélio, resultando num aumento da permeabilidade vascular
Quimase	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Diminuição do crescimento de fibroblastos ✓ Degradação da substância P, um broncoconstrictor libertado por neurónios sensoriais que enervam o epitélio respiratório ✓ Conversão de angiotensina I em II, um potente vasoconstrictor

PAF	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Agregação plaquetária ✓ Aumento da permeabilidade vascular ✓ Contração do músculo liso ✓ Aumento da quimiotaxia de monócitos
MEDIADORES NEOFORMADOS a partir do ácido araquidónico	
PGD₂ (prostaglandina D₂)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Dilatação e permeabilidade vascular ✓ Bronconstrição ✓ Aumento da quimiotaxia de neutrófilos
LTC₄, LTD₄ (leucotrienos)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Edema ✓ Aumento da permeabilidade vascular ✓ Produção de muco
MEDIADORES NEOFORMADOS Citoquinas	
TNF-α	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Aumento da quimiotaxia e crescimento de fibroblastos ✓ Fagocitose ✓ Aumento da libertação de histamina e triptase por mastócitos ✓ Aumento da citotoxicidade de eosinófilos
IL-4	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Regulação positiva de linfócitos-Th2 promovendo assim a síntese contínua de citoquinas (IL-6) e IgE por linfócitos-T
IL-5	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Recrutamento de eosinófilos
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Aumento da produção de IgE ✓ Crescimento e diferenciação de células-T ✓ Aumento da produção de muco
IL-8	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Recrutamento de basófilos

1.2.2 Rinite Alérgica

A rinite alérgica é a forma mais comum de rinite não-infecciosa, sendo uma consequência de reacções de hipersensibilidade imediata a materiais alérgicos

comuns, como o pólen ou ácaros do pó, localizados no tracto respiratório superior por inalação. As manifestações patológicas e clínicas incluem obstrução nasal e espirros, edema da mucosa, infiltração de leucócitos (principalmente eosinófilos), secreção de muco, tosse convulsiva e dificuldades em respirar. Indivíduos que sofram de episódios frequentes e repetitivos de rinite alérgica podem desenvolver pólipos nasais preenchidos com fluído de edema e eosinófilos (Bousquet, J. *et al*, 2008).

1.2.3 Asma Alérgica

A asma alérgica é uma doença caracterizada pelo aumento da hipersensibilidade das vias respiratórias em resposta a estímulos químicos, farmacológicos e/ou imunológicos. Os sintomas mais comuns, isolados ou simultâneos, são episódios de sibilância, tosse convulsiva, broncoconstrição e dispneia (Kay, A.B., 2001; McFadden, E.R. *et al*, 1992).

Este tipo de asma necessita de uma sensibilização inicial dos mastócitos respiratórios pelos anticorpos IgE específicos para o(s) alérgico(s) exposto(s), o que leva a uma reacção imediata onde a subsequente inalação desse(s) alérgico(s) causa a ligação cruzada dos receptores FcεRI, o que resulta na activação de vias secretoras que levam à libertação de mediadores inflamatórios. Isto causa alterações específicas da resposta imediata, vasodilatação, permeabilidade vascular, broncoconstrição e transição para a reacção tardia, a qual envolve linfócitos Th2, eosinófilos, monócitos e basófilos.

Estudos recentes mostraram que a origem da asma pode ter uma componente inflamatória, o que significa que os produtos libertados pelas células inflamatórias têm um papel importante nesta patologia (Ying, S. *et al*, 2006). No entanto, a inflamação por si só não é capaz de explicar várias características típicas da asma crónica, como por exemplo a perturbação estrutural do epitélio bronquial. Ao contrário de outras patologias das vias respiratórias, a descamação epitelial dessas vias parece ser característica da asma, apesar das semelhanças na infiltração de componentes inflamatórios; portanto, ou o epitélio asmático é mais susceptível a danos estruturais ou tem uma resposta alterada a injúrias (Holgate, S.T. *et al*, 2000).

1.3 Epitélio Pulmonar

Durante muito tempo, o epitélio pulmonar foi apenas considerado como uma barreira física à passagem de partículas estranhas provenientes do meio ambiente, como alergénios, agentes patogénicos e tóxicos inalados, para o tecido submucosal. No entanto, estudos recentes reconheceram que as células epiteliais das vias respiratórias são mais do que meras barreiras físicas, respondendo activamente a antigénios inalados e iniciando e aumentando os mecanismos de defesa das vias respiratórias contra os mesmos. Temos então que células epiteliais que se encontram ao longo das vias respiratórias podem regular a imunidade, tanto inata como adaptada, não só através da produção de moléculas funcionais (mediadores lipídicos, factores de crescimento, peptídeos broncoconstrictores, quimiconas e citocinas) como também por interações físicas com células do sistema imune (Knight, D.A. *et al*, 2001; Kato, A. *et al*, 2008

1.3.1 Remoção Mucociliar

A remoção eficiente das partículas inaladas, incluindo vírus e bactérias que penetram nas vias respiratórias, depende da acção coordenada entre o muco secretado, que bloqueia as partículas, e a actividade ritmada dos cílios. O muco é rico em mucinas, que são glicoproteínas complexas de elevado peso molecular que, devido às suas propriedades viscosas, estabelecem interações inespecíficas com as partículas invasoras (Plotkowski, M.C *et al*, 1993). Na região distal das vias respiratórias, onde não se encontram células ciliadas, as partículas são removidas essencialmente pelos macrófagos e pela tosse (Thompson *et al*, 1995).

1.3.2 Modulação da Actividade de Células Inflamatórias

Várias evidências experimentais sugerem que as células epiteliais das vias respiratórias interagem com células inflamatórias (Kato, A. *et al*, 2008). Essa interacção pode ocorrer de várias maneiras, de tal modo que as células epiteliais podem recrutar células inflamatórias através da libertação de substâncias quimiotácteis, direccionar a

migração dessas mesmas células ao longo do epitélio e ainda modular a sua actividade inflamatória através da produção de citocinas. Todas estas vias levam assim à amplificação da resposta inflamatória (Thompson, A.B. *et al*, 1995). Contudo, algumas citocinas podem ter efeitos contrários e as células epiteliais podem libertar moléculas com efeitos predominantemente anti-inflamatórios. Estas acções antagónicas induzidas por citocinas controlam a evolução dos processos inflamatórios e, conseqüentemente, a inflamação crónica do epitélio das vias respiratórias (Denburg, J.A. 1990).

1.3.3 Actividade contra Proteases

Quando activadas, as células inflamatórias, tais como neutrófilos, macrófagos, basófilos e mastócitos, libertam proteases para o exterior. O aumento da concentração destas enzimas nas vizinhanças das células activadas pode levar à degradação de proteínas do parênquima respiratório (Malech, H.L. *et al*, 1987), o que pode estar na origem do enfisema pulmonar e da bronquite crónica. Assim, é essencial manter um equilíbrio entre proteases e antiproteases, de modo a proteger o tecido pulmonar. Em condições normais, o epitélio e o parênquima respiratório estão protegidos dos efeitos de proteases, pela presença de antiproteases em excesso no fluido intersticial (Thompson, A.B. *et al*, 1995). Alguns exemplos destas antiproteases são: o α 1-PI (α 1-inibidor de proteases ou α 1-antitripsina) e o SLPI (Inibidor de leucoprotease secretora), que são inibidores de proteases serínicas; a α 1-macroglobulina, que inibe proteases de quatro grupos distintos (serínicas, metaloproteases, cisteínicas e aspárticas); e a elafina, que é específica para a elastase (Thompson, A.B. *et al*, 1995).

1.3.4 Barreira Epitelial

Os organismos multicelulares têm células especializadas, tanto epiteliais como endoteliais, que formam barreiras entre tecidos e diferentes compartimentos. Estas células são polarizadas, apresentando uma membrana apical e uma basolateral, e aderem umas às outras através de complexos que formam junções (Matter, K. & Balda, M. S., 2003). As junções celulares são então especializações da membrana plasmática, com a função de manter a interacção e ligação entre células e entre células e a matriz

extracelular. Para além disso, contêm componentes que são essenciais às vias de sinalização que regulam a proliferação e diferenciação epitelial.

Vários estudos histológicos de tecido pulmonar demonstraram a presença de junções ao longo das células do epitélio respiratório (Breeze, R. G. & Wheeldon, E. B., 1977; Schneeberger, E.E. *et al*, 1978). Existem três tipos de junções: as de oclusão (TJ – *Tight Junctions*); as aderentes (AJ – *Adherens Junctions*); e os desmossomas, sendo que a presença destas junções torna o epitélio numa barreira impermeável a macromoléculas e agentes infecciosos e limita significativamente as difusões iónicas (Winton, H.L. *et al*, 1998). A intercalar as junção intracelulares estão as junções comunicantes (GJ – *Gap Junctions*), que são poros intercelulares formados por conexinas que permitem a troca de pequenas moléculas hidrofílicas entre as células (Cascio, W. *et al*, 2005).

As TJ são as junções que se encontram mais próximas do domínio apical das células, funcionando como limite físico, e consistem num conjunto de fibrilas contínuas compostas por várias proteínas transmembranares e complexos citosólicos associados com a sua superfície interna (Tabela II, Figura 4) (Anderson, J. M. & Van Itallie, C. M., 1995). A barreira física proporcionada pelas TJ está aparentemente dependente da organização estrutural da actina e uma característica importante é que o correcto arranjo das proteínas membranares das TJ é crucial para que estas sejam funcionais (é neste ponto que os complexos citosólicos se tornam fundamentais) (Denker, B. M. & Nigam, S. K., 1998; Fanning, A.S. *et al*, 1998; 1999). Para além de impedirem a exposição de linfócitos e células APC a possíveis alérgenos, as TJ restringem a difusão lateral de lípidos e proteínas membranares, conferindo desta forma polaridade às células epiteliais (domínio apical vs domínio luminal), o que permite o transporte direccionado de água e iões no epitélio. Para além disso, as TJ promovem a separação física entre um receptor e o seu ligando, sendo que a perda de integridade do epitélio despoleta a ligação dos dois.

Tabela II - Principais características e funções das proteínas transmembranares das TJ e complexos citosólicos associados à sua superfície interna.

PROTEÍNAS TRANSMEMBRANARES	
Ocludina	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Elevada massa molecular (~ 65kDa) ✓ ICAM com 4 domínios transmembranares ✓ Contribui na formação de poros aquosos a nível das TJ ✓ Barreira eléctrica ✓ Processos de sinalização <p>(Fanning, A.S. <i>et al</i>, 1999; Saitou, M. <i>et al</i>, 1998; Tsukita, S. <i>et al</i>, 2001)</p>
Claudina-1 Claudina-2	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Massa molecular:~22 kDa ✓ Proteínas com 4 domínios transmembranares ✓ Expressas diferencialmente em determinados tipos celulares do epitélio ✓ Relacionadas com a diferença de permeabilidade verificada ao longo do epitélio <p>(Coyne, C.B. <i>et al</i>, 2003; Furuse, M. <i>et al</i>, 1998; Tsukita, S. <i>et al</i>, 2001)</p>
JAM	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Massa molecular:~36 kDa ✓ Proteína membrana da família das imunoglobulinas ✓ Regulação da formação das TJ por interacção com ocludina ✓ Regulação do transporte de células imunitárias através da barreira paracelular <p>(Fanning, A.S. <i>et al</i>, 1999; Martin-Padura, I. <i>et al</i>, 1998; Tsukita, S. <i>et al</i>, 2001)</p>
COMPLEXOS CITOSÓLICOS	
ZO-1 ZO-2 ZO-3	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Massas moleculares: ZO-1(~220kDa); ZO-2 (~160kDa); ZO-3 (~130kDa) ✓ Homólogas ✓ Contém domínios PDZ disponíveis para ligar outras proteínas (claudinas e JAM, ambas têm no seu C-terminal motivos capazes de ligar estes domínios) ✓ Recrutam e organizam ocludina nas TJ ✓ ZO-1 liga actina, AF-6, ZAK, fodrina e catenina <p>(Denker, B. M. & Nigam, S. K.,1998; Fanning, A.S. <i>et al.</i>, 1998; 1999; Bauer, H. <i>et al</i>, 2010)</p>
ZONAB Cingulina 7H6 Simplexina	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Reguladores de transcrição e pós-transcrição ✓ Proteínas adaptadoras ✓ Função e moléculas com as quais interagem ainda não são totalmente conhecidas <p>(Matter, K. & Balda, M. S. , 2003)</p>
Proteínas G PKC Tirosina Cinases	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Moléculas de sinalização destes complexos de ligação <p>(Denker, B. M. & Nigam, S. K. , 1998; Fanning, A.S. <i>et al</i>, 1999)</p>

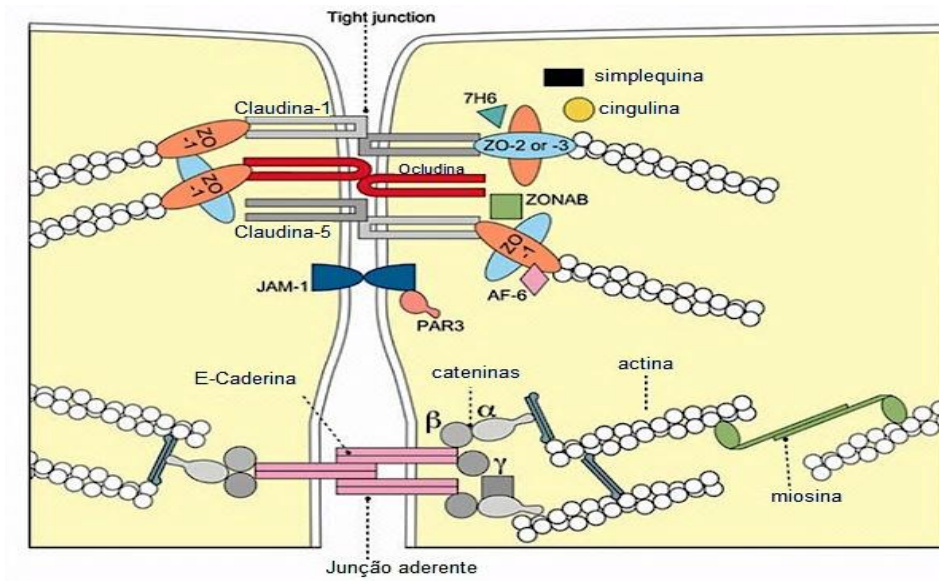


Figura 4 – Composição molecular das TJ e AJ (adaptado de Forster, C., 2008)

1.4 Actividade Proteolítica em Material Alérgico

Nos últimos anos, vários estudos têm sido feitos na tentativa de encontrar qual o mecanismo exacto pelo qual os alérgenos atravessam a barreira epitelial respiratória e conseguem interagir directamente com células dendríticas, facilitando a sensibilização alérgica. Uma vez que a actividade proteolítica é uma característica que tem sido comumente associada a muitos alérgenos, tem sido proposto que esta possa ser responsável pela potenciação da alergenidade. De facto, os alérgenos com actividade proteolítica podem interagir com células epiteliais pulmonares, causando disrupção de junções intercelulares, e/ou activando receptores específicos, o que leva à produção de citocinas pró-inflamatórias. (Matsumura, Y., 2012). Todos estes factores facilitam o acesso dos alérgenos ao sistema imunitário das vias respiratórias, o que conduz ao desenvolvimento de processos inflamatórios nas células epiteliais e à exacerbação de sintomas alérgicos (Figura 5) (Wan, H. *et al*, 1999).

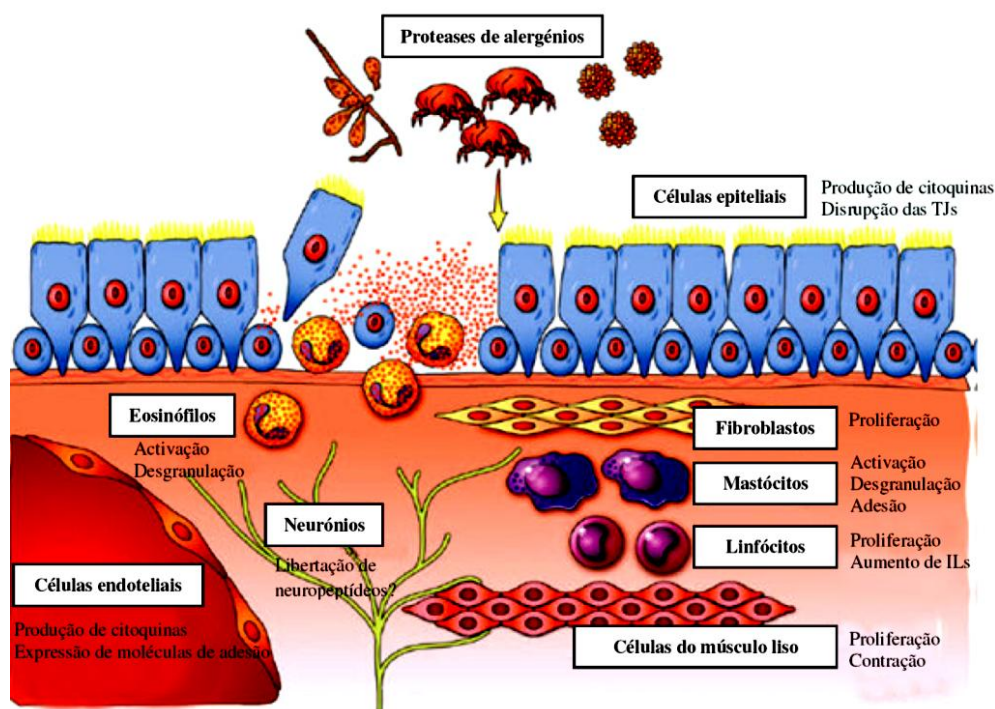


Figura 5 – Proteases de alérgenos aéreos e a inflamação das vias respiratórias (adaptado de Reed, C. E. & Kita, H., 2004).

Uma vez que muitos materiais alérgicos, nomeadamente ácaros, fungos, baratas e pólenes, demonstram ter actividade proteolítica, a comunidade científica tem vindo a ter um interesse crescente em caracterizar as proteases responsáveis por tal actividade.

A classificação destas enzimas é feita consoante o resíduo de aminoácido ou o cofactor envolvido na actividade proteolítica e é usualmente baseada na sensibilidade aos vários inibidores específicos (Barrett, A., 1998). As classes principais incluem proteases serínicas, cisteínicas, aspárticas e metaloproteínases.

1.4.1 Ácaros

Vários investigadores mostraram que os ácaros do pó, nomeadamente *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*, conseguem excretar proteases que levam à amplificação da reacção alérgica. Essas enzimas possuem uma

elevada alergenicidade e encontram-se nas partículas fecais dos organismos mencionados, as quais, ao serem respiradas, depositam-se na mucosa das vias respiratórias, sendo por isso uma das principais causas de reacções asmáticas.

Os principais alergénios dos ácaros pertencem ao grupo 1 (Der p 1 e Der f 1) e apresentam actividade proteolítica do tipo cisteínica, enquanto que os do grupo 3, 6 e 9 são proteases serínicas com homologia para a tripsina, quimiotripsina e a colagenase, respectivamente (Thomas, WR. *et al*, 2002 Takai; T. *et al*, 2005; Donnelly, S. *et al*, 2006). Os alergénios que se encontram melhor caracterizados são Der p 1 e Der f 1, que pensa-se serem capazes de exacerbar a resposta inflamatória através de vários mecanismos: aumentando a permeabilidade da mucosa respiratória (Kalsheker, NA. *et al*, 1996; Roche, N. *et al*, 1997); promovendo a síntese de IgE através da clivagem de CD23 em linfócitos B (Hewitt, CR. *et al*, 1995; Shultz, O. *et al*, 1995; 1997); aumentando a resposta Th2 pela clivagem de CD25 dos linfócitos T (Shultz, O. *et al*, 1998); induzindo a libertação de citocinas pró-inflamatórias do epitélio pulmonar (King, C. *et al*, 1998; Tomee, J.F. *et al*, 1998); causando a disrupção de proteínas constituintes das TJ epiteliais, tais como ZO-1, ocludina e claudina (Figura 6) (Wan, H. *et al*, 1999; 2001); activando o sistema das cininas/calicreínas, o que leva à libertação de um nanopéptido vasoactivo responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, contracção do músculo liso, dilatação dos vasos sanguíneos e dor (Maruo, K. *et al*, 1991); ou ainda induzindo apoptose epitelial, sendo esta independente da hidrólise das TJ (Baker, SF. *et al*, 2003). Todos estes efeitos podem actuar de modo sinérgico, levando à amplificação da reacção alérgica.

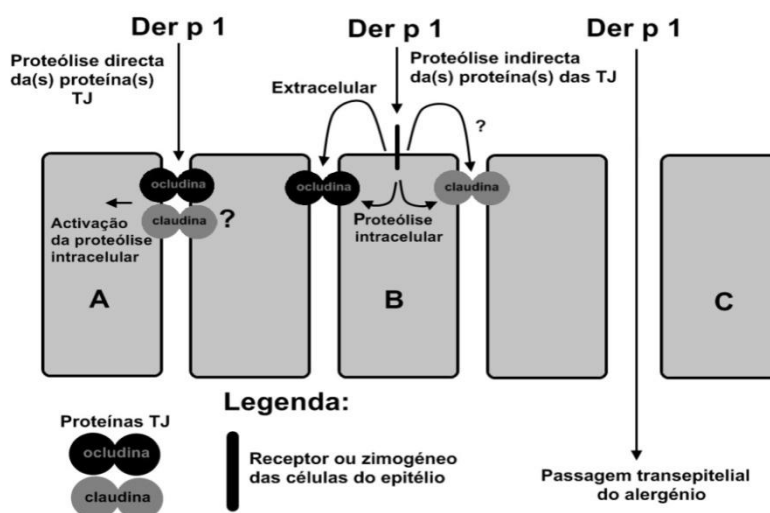


Figura 6 – Representação esquemática do mecanismo de degradação de proteínas das TJ do epitélio pulmonar pelo alergénio proteolítico Der p 1. **A** – Der p 1 actua nos domínios extracelulares da ocludina e possivelmente claudina-1; **B** – Der p 1 activa um zimogénio à superfície celular, que leva à proteólise intracelular; **C** – Passagem transepitelial do alergénio (adaptado de Wan, H. *et al*, 1999).

Estudos mais recentes mostraram que Der p 1 consegue clivar e inactivar várias anti-proteases, inclíndo α_1 -antitripsina, elafina, e SLPI (Brown, A. *et al*, 2003), levando assim a uma troca no ambiente imunitário que origina uma resposta alérgica pró inflamatória (Sakata, Y. *et al*, 2004). Kikuchi e colaboradores provaram que, apesar da arquitectura terciária da Der p 1 não ser capaz, por si só, de induzir a produção de IgE e IgG, a sua actividade proteolítica é crucial para provocar uma resposta imunitária positiva em ratos (Kikuchi, Y. *et al*, 2006). Além disso, Der p 1 é também capaz de inactivar proteínas surfactantes, tais como SP-A e -D (Substância P) (Deb, R. *et al*, 2007), que são predominantemente sintetizadas e secretadas em células alveolares do tipo II, sendo conhecidas não só por terem um papel significativo na defesa inata, como também na agregação e modulação dos leucócitos em bactérias (Wang, J.Y. *et al*, 2007; Forbes, L. R. & Haczku, 2010). Outro mecanismo de acção envolve a activação dos receptores activados por proteases (PARS – *Protease Activated Receptor*), os quais se encontram à superfície celular e estão acoplados a proteína G: quando há clivagem do terminal amínico extracelular destes receptores por acção de proteases serínicas, como Der p 3, ocorre uma resposta inflamatória através do destacamento de células

epiteliais e da produção de IgE (Sun, G. *et al*, 2001; Asokanathan, N. *et al*, 2002; Adam, E. *et al*, 2006).

Apesar das proteases presentes nos tipos de ácaros mencionados já se encontrarem bem caracterizadas, as várias propostas relativas ao seu modo de acção despertaram o interesse de vários investigadores em estudar outros materiais alergénicos e averiguar se proteases presentes nesses mesmos materiais actuam de forma semelhante.

1.4.2 Fungos

Um alargado número de espécies de fungos é conhecido por possuir proteases, nomeadamente fungos anemófilos como é o caso de *Penicilium*, *Epicoccum*, *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Curvularia*, e *Cladosporium*, onde foram identificadas proteases do tipo serínicas (Su, N.Y. *et al*, 1999; Kurup, V.P. *et al*, 2002; Schwab, C.J. *et al*, 2003; 2004; Shen, H.D. *et al*, 2007; Chou H. *et al*, 2008). Por exemplo, no fungo *Epicoccum purpurascens*, uma potente fonte alergénica responsável por muitas doenças respiratórias no mundo, foi demonstrado que a protease serínica Epi p 1 no estado activo assume um papel importante na indução de respostas alérgicas nas vias respiratórias de murinos (Kukreja, N. *et al*, 2008).

As proteases identificadas nas várias espécies de fungos anemófilos mostraram que também desempenham um papel na sensibilização alérgica, tal como vimos anteriormente com *Dermatophagoides*. Por exemplo, Pen ch 13, o principal alergénio de *Penicillium chrysogenum*, é uma protease serínica que causa danos na barreira epitelial pela clivagem de TJ, e que induz uma resposta pró inflamatória em células epiteliais, sendo essa resposta caracterizada pela indução da expressão de mediadores inflamatórios, tais como PGE₂, IL-8, COX-2 e TGF-β₁ (Tai, H.Y. *et al*, 2006). Para além disso, Pen ch 13 leva à diminuição da expressão de CD44 à superfície de células epiteliais bronquiais, pelo que esta molécula tem sido associada à reparação dos danos no epitélio (Tai, H.Y. *et al*, 2010). Em *P. citrinum*, Pen c 13 (equivalente de Pen ch 13 nesta espécie) induziu a expressão de IL-8 em células epiteliais de vias respiratórias humanas, expressão essa induzida pela activação de PARs (Chiu, L.L. *et al*, 2007).

Outros estudos comprovaram que proteases fúngicas de *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata* e *Cladosporium herbarum* induzem alterações morfológicas, destacamento celular e produzem citocinas de modo diferencial (Robinson, B.W.S. *et al*, 1990; Borger, P. *et al*, 1999; Kauffman, H.F. *et al*, 2000). Em *A. fumigatus* foram identificadas as proteases Asp f 2, Asp f 10 e Asp f 13 (Reichard, V. *et al*, 1995; Kurup, V.P. *et al*, 2002), sendo que os alergénios principais são proteases serínicas alcalinas, tais como Asp f 13. Em ratos, esta última foi capaz de induzir resposta inflamatória, síntese de IgE e de ter um efeito sinérgico na resposta imunitária induzida por Asp f 2 (Kurup, V.P. *et al*, 2002; Shen, H.D. *et al*, 2007).

Temos então que a actividade proteolítica associada a alergénios de fungos desempenha um papel adjuvante no desenvolvimento da reacção alérgica. Existe, tal como nos ácaros, uma sensibilização ao alergénio, que é caracterizada quer pelo aumento da permeabilidade do epitélio, facilitando a passagem de proteínas alergénicas, quer pela indução da secreção de mediadores inflamatórios, que mantêm o estado de inflamação do epitélio pulmonar.

1.4.3 Baratas

Vários estudos foram realizados em extractos alergénicos de *Periplaneta americana* (baratas americanas) e *Blattella germanica* (baratas germânicas), os quais apresentam uma actividade proteolítica complexa (Kondo, S. *et al*, 2004; Hivrale, V.K. *et al*, 2005; Sudha, V.T. *et al*, 2007). Uma protease serínica do tipo tripsina de aproximadamente 28 kDa, designada Per a 10, foi purificada e caracterizada a partir de extractos do corpo de *P. americana* (Sudha, V.T. *et al*, 2008; 2009). Por outro lado, um potente alergénio, Bla g 2, foi identificado em *B. germanica* e classificado como sendo uma protease aspártica (Pomés, A. *et al*, 2002; Wünschmann, S. *et al*, 2005); no entanto, Bhat e colaboradores, ao analisarem extractos alergénicos desta mesma espécie de baratas, demonstraram que uma protease serínica pode também estar envolvida em efeitos pró inflamatórios induzidos no epitélio de vias respiratórias (Bhat, R.K. *et al*, 2003).

Em termos de mecanismos de acção, foi provado que alergénios derivados de extractos de baratas conseguem aumentar indirectamente a permeabilidade de células epiteliais de vias respiratórias, através da indução de VEGF (factor de crescimento endotelial vascular), e, desse modo, ter acesso às células dendríticas intraepiteliais (Antony, A.B. *et al*, 2002). Estudos recentes forneceram evidências que implicam a actividade proteolítica de baratas na regulação das citocinas: Lee e colaboradores viram que alergénios de baratas americanas e germânicas conseguem induzir a expressão de IL-8 *in vitro*, sendo essa expressão revertida na presença de inibidores de proteases serínicas (Lee, K. E. *et al*, 2007; Lee, M. F. *et al*, 2010). Tal resultado sugere que os PARs podem desempenhar um papel importante na secreção de IL-8 induzida por alérgenos de baratas em células epiteliais de vias respiratórias humanas (Lee, M. F. *et al*, 2010). Para além de regular os PARs, as proteases presentes em extractos de *B. germanica* também regulam MAP cinases e TNF- α , que levam ao aumento da actividade de IL-6 e IL-8, respectivamente (Page, K. *et al* 2003; 2005; Hong, J.H. *et al*, 2004; Lee, K. E. *et al*, 2007). Estudos semelhantes mostram que, em extractos de *P. americana* e *Blatta orientalis* (baratas orientais), há indução da sensibilização alérgica da mucosa de rato e uma resposta inflamatória via PARs (Wada, K. *et al* 2010; 2011; Arizmendi, N.G. *et al*, 2011).

Apesar de em baratas não terem sido purificadas e caracterizadas tantas proteases como em ácaros e fungos, continua a ser notório o seu envolvimento na sensibilização e/ou na amplificação das respostas imunitária e inflamatória.

1.4.4 Pólenes

São vários os pólenes alergénicos que têm actividade proteolítica; entre eles, podemos destacar os de *Cryptomeria japonica* (cedro japonês), *Chamaecyparis obtusa* (cipreste japonês) e *Juniperus scopularum* (zimbardo das Montanhas Rochosas) que contêm actividade proteolítica serínica (Gunawan, H. *et al*, 2008). Para além disso, em *C. japonica* foi também identificado e caracterizado um alergénio pertencente à classe das proteases aspárticas (Ibrahim, A.R.N. *et al*, 2010) e isolada uma aminopeptidase de 42 kDa (Noguchi, Y. *et al*, 2002). No pólen de *Ambrosia artemisiifolia* (género de erva

daninha), uma das causas principais de polinose na América do Norte, foram purificadas e caracterizadas duas proteases serínicas, uma do tipo quimiotripsina e outra do tipo tripsina (Bagarozzi D.A. *et al*, 1996; 1998), e também identificada actividade proteolítica do tipo cisteínica (Gunawan, H. *et al*, 2008). Também foi caracterizada a actividade proteolítica de pólenes de *Poa pratensis* (erva-de-febra), *Lolium perenne* (azevém-perene), *Cynodon dactylon* (grama bermuda) e *Betula alba* (bétula branca): os mesmos exibem na sua maioria proteases serínicas, sendo que em *P. pratensis*, *L. perenne* e *B. alba* foi também identificada actividade do tipo cisteínica (Raftery M.J. *et al*, 2003; Gunawan, H. *et al*, 2008). Este último tipo de protease foi também identificado em alergénios do grupo I de *Phleum pratense* (género de erva rasteira) (Grobe, K. *et al*, 1999).

As proteases encontram-se frequentemente localizadas na parede celular do pólen, pelo que são facilmente libertadas por secreção do pólen durante a hidratação do mesmo (Knox, R.B. *et al*, 1970). Estas proteases têm uma relevância biológica, pois estão associadas à germinação das plantas, através de clivagens específicas de proteínas precursoras e da mobilização de proteínas armazenadas. No entanto, algumas proteases mostraram que também são capazes de causar danos em células epiteliais de vias respiratórias, estando por isso envolvidas em mecanismos que levam ao desenvolvimento de doenças alérgicas (Widmer, F. *et al*, 2000): Hassim e colaboradores mostraram que proteases libertadas de vários extractos polínicos alergénicos provocam destacamento celular e não são inibidas por antiproteases endógenas (Hassim, Z. *et al*, 1998); enzimas proteolíticas contidas em *A. trifida*, *B. alba*, *P. pratensis* e *L. longiflorum* facilitam a entrega do alergénio ao longo do epitélio, através da degradação de ocludina, o que resulta numa disrupção das TJ epiteliais, sendo que este efeito foi revertido usando inibidores de proteases serínicas e cisteínicas em células epiteliais de vias respiratórias humanas (Runswick, S. *et al*, 2007).

A protease serínica do tipo quimiotripsina identificada em *A. artemisiifolia* consegue inactivar α 1-PI (α 1-inibidor de proteases), um inibidor específico da elastase de neutrófilos, levando a uma degradação incontrollável de tecidos inflamados e a complicações respiratórias associadas a alergias (Bagarozzi D.A. *et al*, 1996). Esta

mesma protease é também capaz de hidrolisar dois neuropéptidos, substância P (SP) e VIP (peptídeo intestinal vasoativo), que são neurotransmissores envolvidos na modulação das vias respiratórias, na secreção da mucosa e na permeabilidade vascular (Stanisz, A. *et al*, 1988; Barnes, P.J., 1991). Um efeito semelhante foi registado numa aminopeptidase de 92 kDa purificada e caracterizada por Matheson e colaboradores no pólen de *Prosopis velutina* (Matheson, N. R. & J. Travis, 1998). Este tipo de hidrólise provoca alterações graves no equilíbrio dos efeitos contrácteis e relaxantes do pulmão, o que leva ao distúrbio da homeostase pulmonar (Bagarozzi D.A. *et al*, 1998; Widmer, F. *et al*, 1998). A protease serínica do tipo tripsina também identificada em *A. artemisiifolia* é capaz de induzir alterações no balanço do sistema renina-angiotensina II das vias respiratórias, o que resulta num aumento da permeabilidade vascular, da inflamação e de edema (Bagarozzi D.A. *et al*, 1998).

Taverna e colaboradores demonstraram que extractos polínicos de *Parietaria judaica*, uma das maiores causas de polinose na área Mediterrânea (D'Amato, G. *et al*, 1992), causam alteração da morfologia celular e aumento da permeabilidade em células endoteliais humanas. Estes efeitos são revertidos por inibidores de proteases, o que sugere o envolvimento destas enzimas na fragilização da mucosa respiratória (Taverna *et al.*, 2008). Posteriormente, em estudos efectuados no nosso laboratório, foi isolada e caracterizada, nesta mesma espécie de polén, uma aminopeptidase de 98 kDa capaz de hidrolisar SP, VIP e angiotensina I e II, o que pode levar a um desequilíbrio na regulação do tónus broncomotor e potenciar a vasodilatação do pulmão. Além disso, a exposição desta protease a células epiteliais resulta na degradação de proteínas das TJ, como ocludina e claudina, e de moléculas de adesão, como E-caderina, o que explica o aumento da permeabilidade celular (Cortes, L. *et al*, 2006; Taverna *et al.*, 2008).

Extractos polínicos com diferentes alergenicidades, como *Olea europea*, *Dactylis glomerata*, *Cupressus sempervirens*, *Pinus sylvestris* (Vinhas, R. *et al*, 2011) *Eucalyptus*, *Plantago* e *Chenopodium* (Gaspar, R., 2012), também possuem actividade proteolítica responsável pelo comprometimento da barreira epitelial. É de salientar ainda que os extractos de *Chenopodium* e *Eucalyptus* foram capazes de activar os PARs

e induzir a libertação de citocinas IL-6 e IL-8 em células epiteliais de vias respiratórias humanas (Gaspar, R., 2012).

É notório, que os estudos efectuados mostram que a actividade proteolítica contida em grãos de pólen pode estar envolvida em mecanismos de sensibilização alérgica. Em outros estudos, foram também purificadas e caracterizadas proteases em pólenes, no entanto esses estudos foram mais direccionados para os efeitos biológicos dessas proteases no próprio pólen e não para os seus efeitos alergénicos (Radlowski, M. *et al*, 1996; Zhang, X. *et al*, 2009). Temos então que poucos são os estudos em que são isoladas as proteases possivelmente responsáveis pelo desencadeamento dos mecanismos de sensibilização alérgica, sendo na maioria dos casos usados extractos polínicos. Assim sendo, torna-se importante purificar e caracterizar as proteases de pólenes, de modo a averiguar se os efeitos observados em extractos são devido às mesmas. Caso sejam, estas proteases podem constituir um bom alvo terapêutico.

1.4.5 Papel das Proteases na Sensibilização Alérgica – Mecanismo Geral

Pelo que vimos nos tópicos anteriores, as proteases identificadas em materiais alergénicos apresentam vários mecanismos de acção, sendo a maioria deles comuns a todos esses materiais. Observou-se então que estas proteases conseguem actuar a vários níveis: causam a disrupção da barreira epitelial, activam receptores específicos (PARs) e clivam moléculas envolvidas na homeostase pulmonar.

A disrupção da barreira epitelial é observada várias vezes pela clivagem de TJ. Este fenómeno permite aos alergénios terem acesso à camada sub-epitelial, onde se encontram as APCs, como é o caso das células dendríticas, que tem como principal função assegurar que qualquer proteína alergénica inalada é apresentada e reconhecida pelos linfócitos T. Para além disso, estas células possuem uma morfologia própria pois conseguem estender os seus pseudópodes entre as células epiteliais até ao lúmen das vias respiratórias, o que lhes confere uma contínua vigilância imune na face luminal do epitélio. Quando estas células capturam os alergénios, levam a uma sucessão de eventos que induz uma resposta inflamatória (ver secção 1.2.1). Assim sendo, apesar de existir um controlo rígido por parte das células dendríticas, as

proteases, ao comprometer a função de barreira epitelial, permitem aos alérgenos, aceder a camadas mais internas e provocar infecções secundárias graves (Wan, H. *et al*, 1999; Reed, C. E. & Kita, H., 2004; Matsumura, Y., 2012).

Outro mecanismo de acção envolve a activação dos PARs. Até hoje, quatro tipos de PARs foram identificados, sendo que estes receptores encontram-se amplamente expressos em células de vasos sanguíneos, tecido conectivo, epitélio, vias aéreas e em leucócitos (Cocks, T.M. *et al*, 2001). Para além das reacções alérgicas mediadas por IgE, as proteases alérgicas podem provocar reacções alérgicas não mediadas por IgE, as quais são desencadeadas através da activação dos receptores mencionados, o que leva à activação de células epiteliais, mastócitos e células dendríticas. Estas, por sua vez, induzem a libertação de mediadores inflamatórios (Kauffman, H.F., 2000). A activação dos PARs ocorre através da clivagem proteolítica do terminal amínico extracelular, o que leva a uma alteração conformacional dos receptores. Esta alteração confere aos receptores propriedades de sinalização celular, pois os mesmos estão acoplados a proteína G (Reed, C. E. & Kita, H., 2004). Em pacientes com asma brônquica, foi possível observar que existe um aumento da expressão de PAR-2 na superfície das células epiteliais (Knight, D.A. *et al*, 2001; Roche, N. *et al*, 2003), sendo que quando estes receptores são activados por agonistas, há indução da constrição dos brônquios humanos. Por outro lado, quando é diminuída a expressão destes mesmos receptores, ocorre uma diminuição da infiltração de células inflamatórias no epitélio e da hiperreactividade associada à resposta induzida pela exposição a alérgenos (Shmidlin, F. *et al*, 2002). Estes receptores mostraram ainda que, ao serem activados, levam à libertação de prostaglandinas e de metaloproteinases (MMPs), que causam aumento da capilaridade e atraem macrófagos e que clivam componentes das TJ, respectivamente (Cocks, T.M. *et al*, 2001; Vermeer, P.D *et al*, 2009).

Em relação à disrupção da homeostase pulmonar, esta foi observada em vários estudos pela clivagem de moléculas como SP (vasoconstrictor) e VIP (vasodilatador). Assim, ao ocorrer hidrólise de SP e VIP, irá ocorrer um desequilíbrio na contracção e relaxação do pulmão, o que favorece o desenvolvimento de doenças alérgicas (Bagarozzi, D.A. *et al*, 1998; Widmer, F. *et al*, 2000). Outro efeito que afecta a

homeostase pulmonar é o balanço de proteases/antiproteases, uma vez que certas proteases conseguem clivar antiproteases como α 1-PI, elafina e SLPI, o que resulta numa degradação de tecidos.

Sendo assim, o possível mecanismo geral da sensibilização alérgica induzida por proteases envolve o comprometimento da barreira epitelial pela degradação de TJ, o que facilita o acesso dos alérgenos às células dendríticas. Se os alérgenos forem enzimaticamente activos, ocorre uma activação dos PARs, que induzem libertação de citocinas e MMPs: as primeiras induzem a maturação das células dendríticas, que migram para os nodos linfáticos; as últimas degradam TJ. De seguida, ocorre produção de quimiocinas por parte destas células dendríticas, que irão permitir o recrutamento de células Th2 nas vias respiratórias, as quais produzem citocinas como IL-4, IL-5, IL-13 e TNF- α , o que leva a uma exacerbação da inflamação nas células epiteliais (Figura 7). Se a todos estes fenómenos ainda juntarmos a perturbação da homeostase pulmonar, é facilmente observável que as proteases constituem um importante motor para a patogénese de doenças alérgicas.

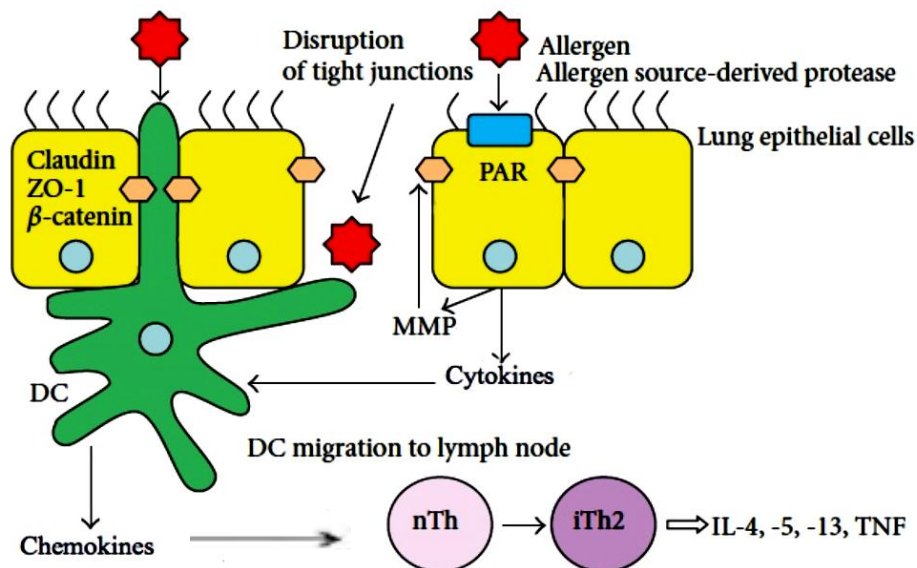


Figura 7 – Mecanismo geral da sensibilização alérgica induzida por proteases (adaptado de Matsumura, Y., 2012).

1.5 Objectivo do Trabalho

A exposição contínua a aeroalergénios, nomeadamente pólenes de plantas anemófilas, tem sido comumente indicada como factor iniciador de doenças alérgicas, como asma e rinite. Como a prevalência dessas doenças tem vindo a aumentar nas últimas décadas, há um interesse crescente por parte dos investigadores em encontrar possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento das mesmas. Vários estudos realçam a importância das proteases em pólenes alergénicos. No entanto, poucos desses estudos visam isolar as proteases, de modo a averiguar se são realmente capazes de desempenhar um papel relevante na sensibilização alérgica.

Neste sentido, o primeiro objectivo deste projecto é a purificação e caracterização de uma protease do pólen de *Chenopodium sp.* A escolha deste pólen surge na continuidade de um estudo preliminar realizado no nosso laboratório, no qual se caracterizou a actividade proteolítica deste pólen (Gaspar, R., 2012). Nesse estudo foi demonstrado que o extracto polínico era capaz de provocar um grande destacamento celular e induzir a libertação de citocinas pró-inflamatórias em células epiteliais, independentemente da baixa quantidade de proteínas libertadas.

O segundo objectivo é avaliar o efeito da protease purificada em mecanismos moleculares associados à sensibilização alérgica, nomeadamente ao nível da permeabilidade celular e da disrupção de junções intercelulares. Assim, numa primeira fase, será avaliado o efeito da protease na permeabilidade celular de células humanas, Calu-3. De modo a tentar perceber como pode ocorrer esta alteração da permeabilidade celular, será depois testado o efeito da protease em termos de degradação de componentes proteicos presentes nas junções intercelulares. Esses estudos serão realizados em células epiteliais caninas MDCK

Assim sendo, espero obter neste estudo uma relação entre a protease e os mecanismos de sensibilização que poderão estar envolvidos no aparecimento de doenças alérgicas. Isto permitirá uma melhor percepção da fisiopatologia destas doenças e poderá, eventualmente no futuro, constituir um bom alvo terapêutico.

Capítulo 2

Material e Métodos

2. Material e Métodos

2.1 Extracto Polínico de *Chenopodium sp.*

A extracção do conteúdo proteico do pólen de *Chenopodium sp.* (Allergon) foi obtida por hidratação do grão de polén numa razão de 20 mg:1ml (m/v) de tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4, durante 2 horas à temperatura ambiente. De seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 12000 × g, durante 10 minutos a 4°C, sendo recuperado o sobrenadante. Este foi então sujeito a um passo de filtração (filtro de 0,45 µm), sendo a fracção resultante designada por extracto inicial.

O extracto polínico de *Chenopodium sp.* foi posteriormente concentrado por ultracentrifugação num dispositivo de filtração *Amicon* de 30 kDa (Millipore). Para isso, pipetou-se 15 ml de extracto para o respectivo dispositivo e centrifugou-se a 3500 × g, a 4°C, durante o tempo necessário para que a fracção concentrada fique com um volume final de 4 ml. A fracção resultante deste processo foi designada por extracto concentrado.

2.2 Purificação de uma Protease presente no Pólen de *Chenopodium sp.*

2.2.1 Cromatografia de Exclusão Molecular

O isolamento de uma protease presente no pólen de *Chenopodium sp.* envolveu vários passos cromatográficos. Numa primeira fase, o extracto concentrado (aproximadamente 3 ml) foi aplicado numa coluna de cromatografia de exclusão molecular *HiLoad 16/600 Superdex 200 pg* (1,6×60 cm, 120 ml, GE Healthcare) em sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) *ÅKTAprime* (Amersham Pharmacia Biotech), previamente equilibrada em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4 (tampão A), a um fluxo de 1 ml/min. A eluição foi realizada com o tampão A, sendo a absorvância dos eluidos seguida continuamente a 280 nm. As fracções com maior absorvância foram então avaliadas para a presença de proteases com o substrato fluorogénico Phe-MCA (*L-Phenylalanine 4-Methyl-Coumaryl-7-Amide*) (Peptide Institute).

2.2.2 Cromatografia de Troca Iónica

As fracções com maior actividade, resultantes da secção 2.2.1, foram combinadas e posteriormente aplicadas (aproximadamente 9 ml) numa coluna de cromatografia de troca iónica *Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q* (0,56×4 cm, 1 ml, Bio-Rad) conectada ao sistema FPLC referido anteriormente. O equilíbrio e a lavagem da coluna foram ambos feitos em tampão A, com fluxo de 0,5 ml/min, sendo a eluição realizada por gradiente linear contínuo de 0 a 0,4 M NaCl em tampão A, durante 40 minutos. A absorvância dos eluidos foi seguida continuamente a 280 nm, sendo posteriormente avaliada a presença de proteases com o substrato Phe-MCA, nas fracções com maior absorvância.

2.2.3 Cromatografia de Afinidade

As fracções mais activas, resultantes da secção 2.2.2, foram combinadas e dialisadas durante a noite, a 4°C, contra 2 L de 20 mM tampão fosfato de sódio pH 7,6 (tampão B). A fracção dialisada foi aplicada (aproximadamente 5 ml) numa coluna de cromatografia de afinidade de Arginina-Sepharose (1×7 cm, 1 ml, Pharmacia Biotech) previamente equilibrada em tampão B. A eluição foi realizada por passos de sal de 0,1-0,25-0,5 M NaCl em tampão B, num volume total de 13,5 ml, sendo posteriormente avaliada a presença de proteases, nas fracções recolhidas, com o substrato Phe-MCA. Por fim as fracções mais activas foram combinadas.

2.3 Quantificação de Proteína

A quantificação de proteína total foi determinada pelo método *Bio-Rad Protein Assay*, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (www.bio-rad.com, Bio-Rad) sendo usado BSA (Soro fetal bovino) como padrão para as curvas de calibração.

2.4 Electroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS

Para poder monitorizar a purificação e estimar a massa molecular da protease presente em *Chenopodium sp*, as diferentes amostras proteicas foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na presença de SDS (SDS-PAGE- *S*odium *D*odecyl *S*ulphate-*P*olyacrylamide *G*el *E*lectrophoresis) (Laemmli, U.K., 1970). Antes de serem aplicadas nos géis, as amostras foram diluídas em solução desnaturante 6x (0,5M Tris-HCl pH 6,8; 30% (v/v) glicerol; 10% (m/v) SDS; 0,6M DTT; 0,012% (m/v) azul de bromofenol) e sujeitas a uma desnaturação térmica a 80°C, durante 20 minutos. Para além das amostras, foi também aplicado a todos os géis um padrão de proteínas pré-coradas com massas moleculares conhecidas entre 11 e 245 kDa (*NZYcolour Protein Marker II*, NZYtech) ou 10 e 250 kDa (*Precision Plus Protein™ Blue Standards*, Bio-Rad).

A separação das proteínas ocorreu em géis de 10% de poliacrilamida sendo a corrida efectuada em tampão de electroforese 100 mM Tris/Bicina; 0,1% (m/v) SDS, num sistema *Mini-Protean II* (Bio-Rad), a 120 V.

2.5 Coloração com *Coomassie Brilliant Blue R250*

Após o SDS-PAGE, os géis foram corados numa solução de 0,25% (m/v) *Coomassie brilliant blue R-250*, 50% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético, durante 30 minutos, e descorados por lavagens sucessivas numa solução 25% (v/v) metanol e 5% (v/v) ácido acético.

2.6 Coloração com Nitrato de Prata

Em alguns casos, como não foi possível visualizar bandas proteicas em amostras coradas com *Coomassie Blue*, procedeu-se à coloração dos géis com nitrato de prata. Para isso, os géis foram fixados numa solução 25% (v/v) metanol e 5% (v/v) ácido acético, durante 30 minutos. Após fixação, foram efectuadas duas lavagens de 10 minutos com 50% etanol e 30% etanol. De seguida, sensibilizaram-se os géis por incubação em 0,02% (m/v) tiosulfato de sódio durante 1 minuto e realizaram-se duas

lavagens de 20 minutos com água destilada. Os géis foram então incubados em 0,2% (m/v) nitrato de prata durante 20 minutos, sendo posteriormente revelados numa solução 0,025% (v/v) formaldeído, 3% (m/v) carbonato de sódio anidro e 0,001% (m/v) tiosulfato de sódio. Uma vez obtida a coloração pretendida, parou-se a revelação com 0,4M Tris contendo 2,5% (v/v) ácido acético e, por fim, guardou-se os géis em água destilada à temperatura ambiente.

2.7 Electroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Nativas

A actividade proteolítica quer do extracto de *Chenopodium sp.*, quer das amostras resultantes dos vários processos de purificação, foi avaliada por electroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (Native-PAGE- *Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Para tal, as diferentes amostras foram separadas num gel de 10% de poliacrilamida, na ausência de SDS, no sistema *Mini Protean II* (Bio-Rad) (Laemmli, U.K., 1970). Antes de serem aplicadas nos géis, as amostras foram previamente diluídas em solução nativa 2x (200mM Tris-HCl pH 6,8; 30% (v/v) glicerol e 0,012% (m/v) azul de bromofenol), deixando-se incubar 10 minutos à temperatura ambiente. Para além das amostras, foi também aplicado a todos os géis um padrão de proteínas pré-coradas com massas moleculares conhecidas entre 10 e 250 kDa (*Precision Plus Protein™ Blue Standards*, Bio-Rad). A corrida dos géis foi efectuada em tampão de electroforese 100 mM Tris/Glicina pH 8,3, a 120 V. Depois da corrida, as amostras foram incubadas em 50 mM Tris-HCl pH 7,4 (tampão A) com 100 µM Phe-MCA durante 1 hora a 37°C (Manchenko, G.P, 2002). Por fim, após decorrido o tempo de incubação, os géis foram lavados rapidamente com tampão A e revelados num detector *EXQuest™ Spot Cutter* (Bio-Rad), a 380 nm.

2.8 Caracterização Enzimática da Protease Purificada

2.8.1 Ensaios Enzimáticos

A actividade proteolítica presente tanto no extracto polínico de *Chenopodium sp.*, como nas diferentes fracções resultantes do processo de purificação, foi caracterizada usando substratos acoplados à molécula fluorescente

MCA (*4-Methyl-Coumaryl-7-Amide*) (Peptide Institute). Para estes ensaios, foram utilizados cerca de 18 µg de extracto polínico, e entre 0,26 e 12 µg de fracções resultantes da purificação. Todos os ensaios foram realizados num volume final de 202 µL em tampão A, com 0,1 mM de Phe-MCA; Leu-MCA; Lys-MCA. A hidrólise dos substratos leva à libertação do grupo MCA (Ex_{380nm} , Em_{460nm}), provocando assim um aumento da fluorescência. Esta fluorescência foi monitorizada em intervalos de 20 segundos, durante 12 minutos, a 37°C, numa placa *Microtiter* de 96 poços (Corning Life Sciences), usando um fluorímetro *SpectraMax® Gemini EM* (Molecular Devices). Além disso, foi realizada uma curva padrão MCA, de modo a permitir a quantificação de MCA libertados ao longo do tempo. Para o controlo positivo da actividade proteolítica das proteinases, pré-incubaram-se as mesmas em tampão do ensaio durante 10 minutos à temperatura ambiente e com agitação moderada

2.8.2 Ensaio de Inibição Enzimática

De forma a poder identificar a classe da protease purificada, foram realizados ensaios de inibição enzimática nas diferentes fracções resultantes do processo de purificação. Deste modo, foram utilizados inibidores específicos para as diversas classes proteolíticas conhecidas, consoante as concentrações referidas na Tabela III.

Para estes ensaios, foram utilizados entre 0,26 e 12 µg de fracções resultantes da purificação, sendo estas amostras previamente incubadas com os inibidores específicos, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Passado o tempo de incubação, foi adicionado 0,1 mM do substrato preferencial MCA, sendo o aumento da fluorescência monitorizado como descrito em 2.8.1. Todos estes ensaios foram realizados num volume final de 202 µL em tampão A. Os resultados são apresentados em actividade residual relativa em comparação com a condição controlo sem inibição.

Tabela III - Inibidores específicos e iões metálicos utilizados nos ensaios de inibição da actividade proteolítica, suas respectivas proteases-alvo e concentrações efectivas.

INIBIDOR	PROTEASES-ALVO	CONCENTRAÇÃO EFECTIVA (mM)
AEBSF	Serínicas	10
Bestatina	Aminopeptidases	0.01
E-64	Cisteínicas	0.01
EDTA	Metaloproteases	10
TLCK	Serínicas do tipo-tripsina	1
TPCK	Serínicas do tipo-quimotripsina	1
IÕES METÁLICOS	CONCENTRAÇÃO EFECTIVA (mM)	
Ca ²⁺	1	
Mg ²⁺		
Mn ²⁺		
Zn ²⁺		

2.9 Cultura e Manutenção de Células Calu-3 e MDCK

Duas linhas celulares (American Type Culture Collection), Calu-3 e MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), foram utilizadas como modelos experimentais.

As células Calu-3, uma linha celular de epitélio brônquico humano, foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino inactivado pelo calor (56°C durante 30 minutos), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. De seguida, as

culturas foram mantidas em frascos de cultura de 75 cm² (Orange Scientific), com 15 ml de meio, a 37°C, sob atmosfera com 5% CO₂ e 95% ar. Quando atingida a confluência, as células foram diluídas de 1:2, sendo para isso tripsinizadas a 37°C durante 10-15 minutos usando uma solução de 0,25% (m/v) tripsina, 1 mM EDTA em meio salino contendo 130 mM NaCl, 3mM KCl, 1 mM Na₂PO₄, 30 mM HEPES e 10 mM glicose a pH 7,3. O meio DMEM foi renovado cerca de três vezes por semana e as experiências foram realizadas com células compreendidas entre as passagens 25 e 40.

As células MDCK, uma linha celular de epitélio renal canino, foram cultivadas da mesma forma do que as Calu-3, diferindo apenas na diluição (1:10) e na passagens utilizadas para experimentação (entre 15 e 30)

2.10 Medição da Permeabilidade Transepitelial

As células Calu-3 foram cultivadas em placas de 12 *transwells* permeáveis, com filtros de poliéster de 0,4 µm (Corning Life Sciences), numa densidade de 1.5×10⁵ células/cm² e seguindo as mesmas condições de cultura descritas em 2.7. As *transwells* são constituídas por um sistema de duas câmaras: uma câmara superior, designada de *insert*, onde são cultivadas as células, e uma inferior, onde é colocado meio de cultura. As células foram mantidas numa interface ar-líquido, sendo examinadas diariamente ao microscópio de modo a avaliar a sua confluência, integridade e uniformidade. Quando necessário, o *insert* foi lavado com tampão fosfato alcalino estéril (PBS-10 mM Na₂PO₄; 1,8mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl a pH 7,4) e o meio de cultura da câmara inferior foi renovado. Uma vez atingida a confluência, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas 2 horas com meio de cultura sem soro. De seguida, as células foram incubadas durante 12 horas com dois estímulos: o extrato polínico de *Chenopodium sp.*; e a fracção resultante da cromatografia de troca iónica, que contém a protease parcialmente purificada. Como controlo de cada estímulo, incubaram-se as células com tampão A e com 0.2 M de NaCl em tampão A (tampão C), respectivamente. Para além disso, as células foram incubadas 12h com os estímulos tratados previamente, com 10 mM AEBSF, sendo como respectivo controlo incubadas as células apenas com 10 mM de AEBSF e tampão A ou C. Realizou-se também um

“branco”, semelhante aos controlos, mas que não contém a monocamada de células. Todas as incubações foram realizadas a 37°C com 5% CO₂.

Após decorrido o tempo de estímulo, foi adicionado aos *inserts* da *transwell* 50 µl de 10 µM RITC-Dex 70S preparado em PBS (Dextrano de 70 kDa associado a uma molécula fluorescente de Isotiocianato de Rodamina B) (Sigma-Aldrich). Posteriormente, foram recolhidas amostras de 50 µl da câmara inferior, de 30 em 30 minutos, durante 4 horas, sendo apenas recolhida uma amostra de 50 µl do *insert* no final das 4 horas. Estas amostras foram colocadas numa placa opaca de 96 poços (Corning Life Sciences) sendo depois determinado os valores de fluorescência num fluorímetro *SpectraMax® Gemini EM* (Molecular Devices), usando um comprimento de onda de excitação de 530±25nm e emissão de 590±35nm (SoftMax Pro v5 software).

A fluorescência obtida para cada ponto foi normalizada relativamente à fluorescência do *insert*, sendo que este *ratio* foi depois ajustado ao volume da câmara inferior. O *ratio* corrigido foi colocado em ordem ao tempo, sendo o declive da recta correspondente à taxa de difusão de RITC-Dex. Esse declive permite determinar a permeabilidade transepitelial em cm/s. As mesmas transformações foram efectuadas para o “branco” (permeabilidade do filtro membranar), o qual foi subtraído à permeabilidade para cada estímulo.

2.11 Preparação de Extractos Celulares

Para avaliar a integridade das proteínas constituintes das junções intercelulares foram preparados extractos de células MDCK, previamente tratadas (6h) com diferentes estímulos.

As células foram crescidas em placas de 6 poços (Corning Life Sciences) com uma densidade de 5x10⁴ células/cm². Quando foi atingida a confluência das células, estas foram lavadas com PBS e com meio de cultura sem soro, sendo posteriormente incubadas 6h com dois estímulos diferentes: o extrato polínico de *Chenopodium sp.*; e a fracção resultante da cromatografia de troca iónica, que contém a protease parcialmente purificada. Como controlo as células foram incubadas, respectivamente,

com tampão A e com tampão C. Para além disso, as células foram incubadas 6h com os estímulos tratados previamente, com 10 mM AEBSF, sendo como respectivo controlo incubadas as células apenas com o inibidor e tampão A ou C. Todas as incubações foram realizadas a 37°C sob atmosfera com 5% CO₂

Uma vez decorrido o tempo de estímulo, as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo uma mistura de inibidores de proteases (1µg/ml CLAP - Quimiostatina, Leucina, Antipaina e Pepstatina; 1mM DTT; 0,1 mM PMSF). De seguida, foi adicionado mais 150 µl de PBS com inibidores e procedeu-se à raspagem das células para tubos de 1,5 ml. Os extractos celulares foram então centrifugados a 13000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415 D*), durante 6 minutos, a 4°C, sendo o precipitado ressuspendido em 150 µl de solução desnaturante 2x (100 mM Tris-Bicine, 6M ureia, 4% (m/v) SDS, 4% (v/v) β-mercaptoetanol e 0,012% (m/v) azul de bromofenol), previamente aquecida. Depois de 10 minutos em gelo, as amostras foram sonicadas três vezes com pulsos de 5 segundos, novamente centrifugadas (13000 rpm, durante 6 minutos) e o sobrenadante foi recolhido e desnaturado a 95°C durante 10 minutos

2.12 Imunodeteção

Para analisar por imunodeteção as proteínas dos extractos celulares preparados em 2.9, procedeu-se à separação destas num gel de 10% SDS-PAGE (conforme descrito em 2.4.1). Após electroforese, as proteínas foram transferidas, por electrotransferência, do gel para uma membrana de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*) (Millipore), previamente activada em metanol durante 30 segundos, e equilibrada em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% (v/v) metanol) durante 10 minutos. A electrotransferência foi efectuada a 100 V durante 1 hora, à temperatura ambiente, em tampão de transferência contendo 0,013% (m/v) SDS.

Uma vez concluída a transferência, as membranas foram bloqueadas com 3 lavagens com uma solução de 0,25% de leite magro em TBS-T (20mM Tris-HCl pH 7,6; 137 mM NaCl; 0,1% (v/v) *Tween*[®] 20), usando um sistema *SNAP i.d.*[®] (Millipore). De seguida, cada membrana foi incubada, durante a noite a 4°C, com com um anticorpo primário diluído em 0,5% (m/v) de leite magro em TBS-T: anti-occludina (1:500); anti-

claudina-1 (1:250); anti-ZO-1 (1:250); ou anti-E-caderina (1:500) (Zymed Laboratories Inc.). Depois, as membranas foram lavadas 3 vezes com 0,5% leite magro em TBS-T, usando o sistema *SNAP i.d.*[®], e incubadas, durante 2 horas a 4°C, com o respectivo anticorpo secundário acoplado à fosfatase alcalina: *anti-rabbit* (1:5000) ou *anti-mouse* (1:20000) (GE Healthcare), diluído em 0,5% leite magro em TBS-T. Após incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e incubadas com o reagente ECF (GE Healthcare), durante 5 minutos à temperatura ambiente. Uma vez secas, foi possível visualizar a marcação das membranas usando um detector *VersaDoc*[™] (Bio-Rad).

As membranas podem ser marcadas novamente com outros anticorpos primários e secundários, mas para isso, é necessário remover a marcação anterior. Esta remoção implica a lavagem das membranas durante 5 minutos em água destilada, 10 minutos em 0,2 M NaOH, seguida de uma nova lavagem de 5 minutos em água.

Como controlo interno da quantidade e dos níveis de degradação de proteína em cada amostra, as membranas foram marcadas com um anticorpo primário contra uma proteína ubíqua nas células, anti- β -actina (Sigma-Aldrich), diluído em 0,5% de leite magro em TBS-T (1:5000).

A quantificação da densidade das bandas proteicas resultantes da análise por imunodeteção foi realizada através do programa *ImageJ*.

2.13 Análise Estatística dos Resultados

Os resultados quantitativos deste trabalho estão representados em médias \pm erro padrão do número de experiências realizadas. Para o tratamento estatístico foi utilizado o programa *GraphPad Prism*, e, dependendo das experiências, foi aplicado o One-way ou 2way ANOVA, seguido do teste de Dunnett (comparação das varias situações em relação ao controlo) ou de Tukey (comparação múltipla de resultados). As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0.05$.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

3.1 Purificação de uma Protease presente no Pólen de *Chenopodium sp.*

Quando o pólen é inalado, sofre um processo de hidratação à superfície da mucosa respiratória, que leva à libertação de vários solutos: alergénios, proteases, lipoproteínas, polissacarídeos, lípidos e compostos fenólicos (Gunawan H., et al. 2008). A concentração dos solutos libertados pode variar com a intensidade da exposição ao pólen, localização geográfica e época do ano, podendo atingir elevadas concentrações locais (50 mg/ml) (Hassim, Z. *et al.*, 1998). Sendo assim, o conteúdo dos grãos de pólen de *Chenopodium sp.* foi obtido por hidratação do pólen numa proporção de 20 mg:1ml (m/v) de tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4. Este processo foi realizado durante 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação lenta e sem uso de força mecânica, de forma a mimetizar o processo de hidratação que ocorre *in vivo*. O extracto polínico resultante foi posteriormente aplicado num dispositivo de filtração Amicon de 30 kDa, de modo a concentrar a quantidade total de proteína, e eliminar algumas moléculas de baixo peso molecular, como é o caso dos pigmentos.

Para poder isolar a protease responsável pela actividade proteolítica maioritária do pólen de *Chenopodium sp.*, procedeu-se ao fraccionamento do extracto polínico. Este fraccionamento consistiu numa série de processos cromatográficos sequenciais, nomeadamente: exclusão molecular, troca iónica e afinidade. Uma vez que, em estudos preliminares (Gaspar, R., 2012), foi determinado que o substrato preferencial do extracto polínico era Phe-MCA, foram realizados ensaios enzimáticos com este substrato de modo a avaliar a presença de proteases em cada uma das fracções recolhidas nos passos de purificação. Assim, numa primeira fase, procedeu-se a uma cromatografia de exclusão molecular *Superdex 200* (1,6×60 cm, 120 ml) (Figura 10), com o intuito de eliminar a totalidade dos pigmentos presentes no extracto e as proteínas de baixo peso molecular.

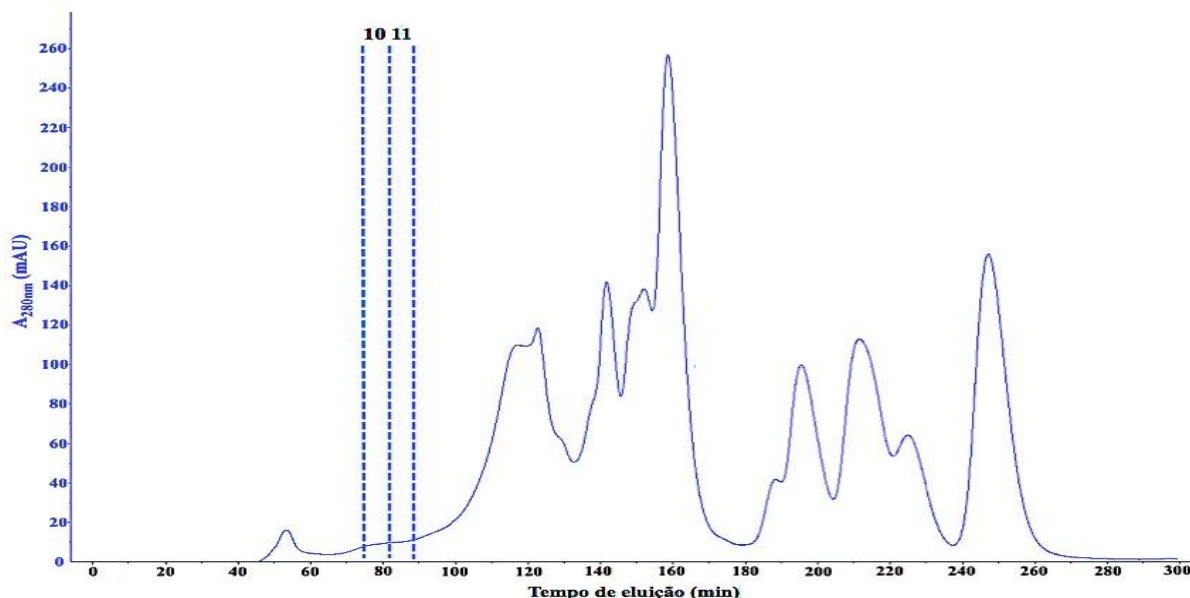


Figura 10 – Cromatograma da cromatografia de exclusão molecular. Foram injectados 3 ml de extracto concentrado de *Chenopodium sp.* à coluna *HiLoad 16/600 Superdex 200 pg* (1,6×60 cm, 120 ml) previamente equilibrada em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4 (tampão A). A eluição foi realizada ao fluxo de 1 ml/min em tampão A, num sistema FPLC. As fracções relevantes estão identificadas com números.

Todas as fracções com maior absorvância a 280 nm, eluidas da cromatografia de exclusão molecular *Superdex 200* (1,6×60 cm, 120 ml), foram testadas para a sua actividade proteolítica. As fracções 10 e 11 (Figura 10) foram então combinadas, uma vez que possuíam maior actividade proteolítica do que as restantes fracções resultantes deste passo de purificação. A fracção resultante foi designada de mistura de exclusão molecular (Mist EM). Foi realizado um cálculo teórico de modo a poder estimar a massa molecular correspondente aos tempos de eluição da Mist EM na coluna *HiLoad 16/600 Superdex 200 pg* (1,6×60 cm, 120 ml): os valores obtidos variam entre 52,6 e 66,8 kDa (proteincrytallography.org). Isto indica portanto que a protease responsável pela actividade da Mist EM varia entre esses valores de pesos moleculares.

De seguida, a mist EM foi aplicada numa cromatografia de troca iónica *High Q* (0,56×4 cm, 1 ml) (Figura 11). A escolha desta cromatografia prende-se com o facto de estudos anteriores terem demonstrado, por zimografia bidimensional, a presença de

proteases com pontos isoeléctricos (pIs) ácidos no extracto polínico de *Chenopodium sp.* (Gaspar, R., 2012), pelo que, quando numa solução com pH superior ao seus pIs, essas proteases irão apresentar carga negativa. Assim, uma vez que a coluna utilizada é um trocador aniónico, todas as proteínas com uma carga negativa a pH 7,4 irão interagir reversivelmente com a matriz. Para eluir as proteínas que ligaram à coluna, foi aplicado um gradiente salino crescente, o que faz com que as proteínas com interacção electrostática mais fraca desliguem primeiro do que aquelas com interacção mais forte.

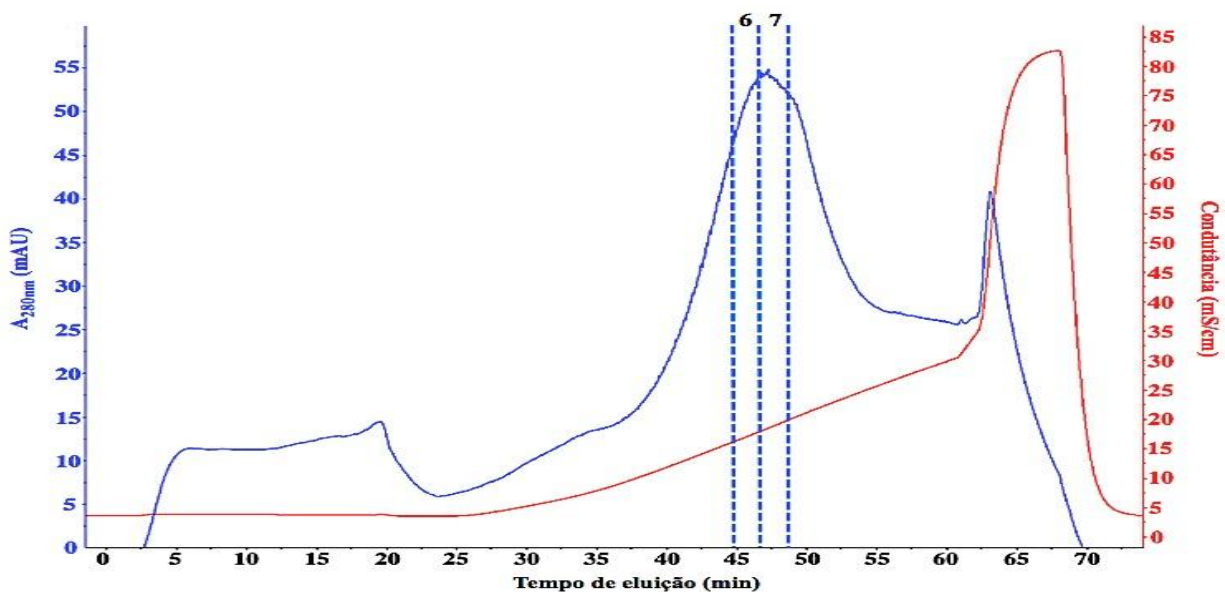


Figura 11 – Cromatograma da cromatografia de troca iónica. Foram injectados 9 ml de mist EM à coluna *Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q* (0,56×4 cm, 1 ml), previamente equilibrada em tampão A. A eluição foi realizada por gradiente linear contínuo de 0 a 0,4 M NaCl em tampão A, durante 40 minutos ao fluxo de 0,5 ml/min, num sistema FPLC . As fracções relevantes estão identificadas com números.

Após testada a actividade proteolítica de todas as fracções recolhidas na cromatografia de troca iónica *High Q* (0,56×4 cm, 1 ml), procedeu-se à mistura das fracções activas, nomeadamente, as fracções 6 e 7 (Figura 11). A fracção resultante foi designada de mistura de troca iónica (Mist TIQ).

Finalmente, para poder estabelecer uma interacção mais específica entre a protease de interesse e outra matriz, procedeu-se a uma cromatografia de afinidade

de Arginina-Sepharose (1×7 cm, 1 ml). A escolha desta cromatografia deve-se a estudos efectuados por Gaspar, que conseguiu demonstrar que o extracto polínico de *Chenopodium sp.* possui especificidade para o aminoácido Arginina (Gaspar, R., 2012). Assim, uma vez que a matriz utilizada nesta cromatografia contem arginina imobilizada em Sepharose, espera-se obter uma especificidade entre a protease de interesse e a matriz, permitindo uma purificação eficiente. Para poder aplicar a Mist TIQ à coluna de Arginina-Sepharose (1×7 cm, 1 ml), foi necessário dialisar esta amostra. A diálise tem como objectivo remover o excesso de sal em solução. Neste caso, este passo é crucial uma vez que a Mist TIQ está contido num meio salino (Figura 11), e um elevado conteúdo salino pode afectar a capacidade de ligação de proteínas neste tipo de cromatografias (Tsumoto, K. *et al*, 2007). Após diálise, a Mist TIQ foi aplicada na cromatografia de afinidade de Arginina-Sepharose. As proteínas ligadas à matriz foram eluidas por três passos salinos (0,1-0,25-0,5 M NaCl em 20 mM tampão fosfato de sódio pH 7,6) e todas as fracções recolhidas foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 12) e testadas para a sua actividade proteolítica.

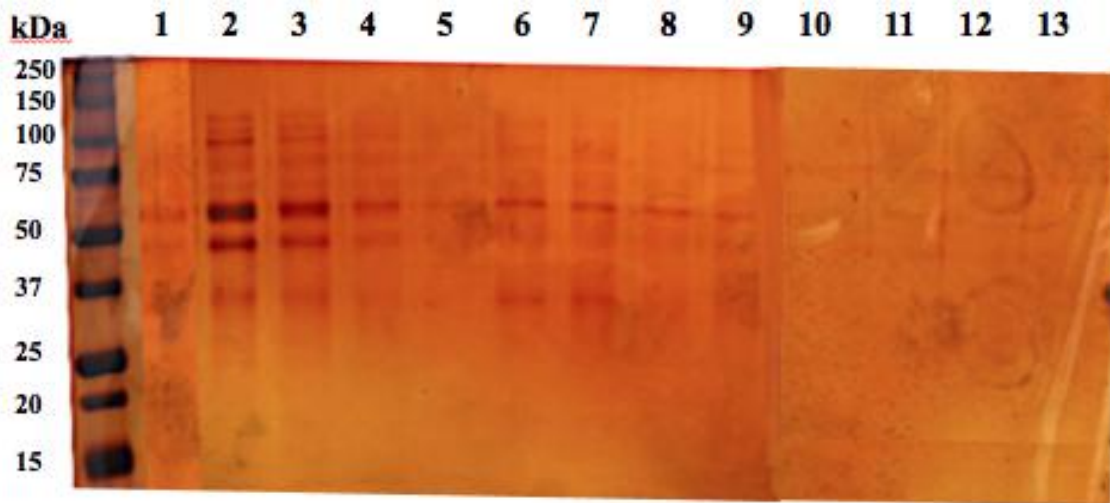


Figura 12 – Análise por SDS-PAGE das fracções recolhidas na cromatografia de afinidade. Foram aplicados 5 ml de Mist TIQ, previamente dialisada contra 20 mM tampão fosfato de sódio pH 7,6 (tampão B), à coluna de Arginina-Sepharose (1×7 cm, 1 ml). Esta coluna foi previamente equilibrada em tampão B, sendo a eluição realizada por passos de sal de 0,1-0,25-0,5 M NaCl em tampão B num volume total de 13,5 ml. As fracções recolhidas foram analisadas por SDS-PAGE em géis de 10% de poliacrilamida, tendo sido aplicados 30µl de amostra em cada poço. Os géis foram revelados por coloração com nitrato de prata. **Poço 1** - fracção não ligante; **Poços 2-5** – fracções de lavagem; **Poços 6-8** – fracções eluidas com 0,1 M NaCl em tampão B; **Poços 9-11** – fracções eluidas com 0,25 M NaCl em tampão B; **Poços 12-13** – fracções eluidas com 0,5 M NaCl em tampão B.

Como é possível observar pela Figura 12, existe uma banda de cerca de 60 kDa nas três primeiras fracções de lavagem e nas três fracções do primeiro passo de eluição salina, sendo que, em termos de actividade proteolítica, todas essas fracções apresentaram actividade contra o substrato Phe-MCA. Assim sendo, supõe-se que esta banda de 60 kDa seja correspondente à protease parcialmente purificada. A presença desta protease e consequente actividade proteolítica nas fracções de lavagem pode indicar uma saturação da coluna e/ou uma baixa afinidade da proteína pelo aminoácido arginina presente na coluna. Assim, as três fracções resultantes do primeiro passo de eluição foram combinadas, uma vez que apresentaram maior actividade proteolítica e à partida encontravam-se mais puras do que as lavagens. A fracção resultante foi designada de mistura de Arginina (Mist Arg).

Todos os resultados referentes à quantificação de proteína e aos ensaios de actividade proteolítica com o substrato Phe-MCA, obtidos ao longo de todo o processo de purificação, encontram-se sintetizados na Tabela IV.

Tabela IV - Tabela de purificação da protease do pólen de *Chenopodium sp.*

PASSOS PURIFICAÇÃO	PROTEÍNA TOTAL (µg)	ACTIVIDADE TOTAL (nmol/min)	ACTIVIDADE ESPECÍFICA (U/ µg prot)	RENDIMENTO (%)	FACTOR PURIFICAÇÃO
Extracto pólen	746,50	10,74	0,014	-	-
<i>Superdex 200</i> (Mist EM)	358,02	22,38	0,063	100	4,50
<i>High Q</i> (Mist TIQ)	147,50	14,68	0,099	65,6	7,07
Arginina Sepharose (Mist Arg)	13,20	5,00	0,379	22,3	27,1

Os ensaios foram realizados em 50 mM Tris-HCl pH 7,4, a 37°C, com uma concentração efectiva de substrato Phe-MCA de 0,1 mM. 1 Unidade de actividade = nmol MCA libertada/min.

Como se pode observar pela Tabela IV, os sucessivos passos de purificação permitiram purificar 13,2 µg de protease a partir de 800 mg de pólen, ocorrendo alguma perda de proteína ao longo de todo o processo. Para além disso, a mistura final (mist Arg) resultou na recuperação de 22,3% da actividade da Mist EM, tendo sido purificada 27 vezes em relação ao extracto inicial. É importante referir que o extracto polínico de *Chenopodium sp.* apresenta uma cor amarela forte, devida a uma elevada quantidade de pigmentos. A presença destes pigmentos podem interferir na leitura do ensaio enzimático (Ex_{380nm} , Em_{460nm}), e na quantificação de proteína (595 nm), pois ambos ocorrem na região do visível. Assim, quer os valores de quantidade de proteína, quer os valores de actividade proteolítica no extracto polínico, podem não corresponder realmente ao apresentado na Tabela IV. É por isso que a Mist EM foi

considerada o passo inicial de purificação para o cálculo do rendimento, pois a partir desta amostra já não se verifica a presença de pigmentos, uma vez que a totalidade destas moléculas foi eliminada por cromatografia de exclusão molecular.

De modo a obter um perfil proteico de todo o processo de purificação, foi efectuado um SDS-PAGE com as diferentes misturas resultantes dos vários passos cromatográficos (Figura 13 A). Paralelamente, para poder obter um perfil proteolítico de todo o processo de purificação, foi realizado um Native-PAGE (Figura 13 B) com essas mesmas amostras. Esta técnica, é semelhante ao SDS-PAGE, contudo não se realiza a desnaturação térmica das amostras nem uniformização da carga das proteínas pelo SDS. Assim, enquanto que no SDS-PAGE a mobilidade electroforética das proteínas depende principalmente das suas massas moleculares, no Native-PAGE a mobilidade depende tanto da carga das proteínas como da conformação das mesmas. Neste caso específico, as amostras foram preparadas em condições não desnaturantes, de modo a preservar a forma nativa e actividade das enzimas, e corridas num gel de 10% de poliacrilamida. Após electroforese, incubou-se os géis em tampão favorável à actividade proteolítica na presença de 100 μ M Phe-MCA durante 1 hora a 37°C, uma vez que se trata do substrato preferencial das proteases do extracto polínico de *Chenopodium* sp. A revelação do gel é feita num detector de fluorescência, visto que o substrato adicionado vai ser clivado quando na presença de proteases, permitindo assim a visualização de bandas fluorescentes nos locais onde se encontram essas enzimas.

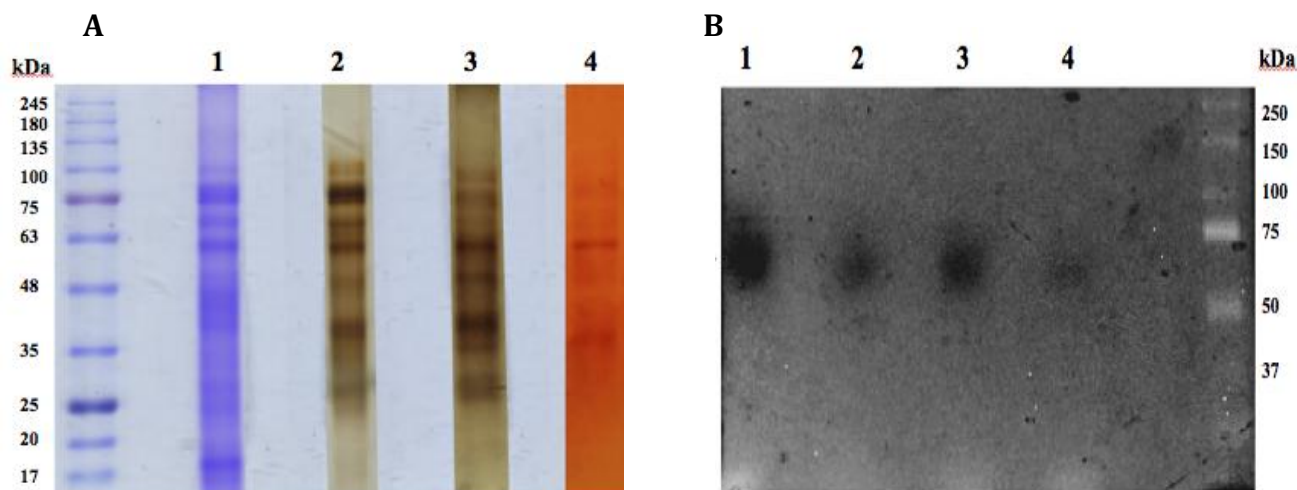


Figura 13 – A- Perfil proteico do processo de purificação da protease de *Chenopodium sp.* As várias fraccções de interesse foram combinadas e analisadas por SDS-PAGE em géis de 10% de poliacrilamida, tendo sido aplicados 30µl de amostra em cada poço. Os géis foram revelados por coloração com Coomassie brilliant blue R-250 ou nitrato de prata, dependendo da quantidade de proteína. **Poço 1** – Extracto concentrado de *Chenopodium sp.*; **Poços 2** – Mist EM; **Poços 3** – Mist TIQ; **Poços 4** – Mist Arg. **B-** Perfil proteolítico do processo de purificação da protease de *Chenopodium sp.* As várias fraccções de interesse foram combinadas e analisadas por Native-PAGE em géis de 10% de poliacrilamida, tendo sido aplicados 30µl de amostra em cada poço. Os géis foram incubados em tampão A com 100 µM Phe-MCA durante 1 hora a 37°C. **Poço 1** – Extracto concentrado de *Chenopodium sp.*; **Poços 2** – Mist EM; **Poços 3** – Mist TIQ; **Poços 4**–Mist Arg.

A Figura 13A mostra de forma evidente que os vários processos cromatográficos permitiram a purificação de uma proteína de cerca de 60 kDa, como aliás já tinha sido demonstrado na Figura 12. Este peso molecular corresponde a gama de pesos moleculares das proteases presentes na Mist EM. Assim, tudo indica que se purificou uma protease solúvel de 60 kDa. Uma vez que essa protease apresenta pesos muito semelhantes em condições nativas (Cromatografia de Afinidade) e desnaturantes (SDS-PAGE), é possível que se trate de um monómero. Além disso, é possível observar a importância do passo de cromatografia de exclusão molecular na eliminação de proteínas de baixo peso molecular (região abaixo dos 25 kDa). Por outro lado, as cromatografias de troca iónica e afinidade permitiram respectivamente, eliminar uma grande quantidade de proteínas de alto peso molecular (região acima

dos 70 kDa), e proteínas abaixo dos 60 kDa (região entre os 35 kDa e 60 kDa). Na Figura 13B, é possível visualizar uma banda fluorescente de 60 kDa, sinónima de actividade proteolítica, e comum a todos os passos cromatográficos. É notória a diminuição da intensidade dessa banda entre a cromatografia de exclusão molecular e a cromatografia de afinidade, o que indica a perda de alguma quantidade de protease ao longo do processo de purificação. Além disso é possível corroborar que a protease possui um *pI* ácido, uma vez que ocorre migração da protease no gel, o que indica que apresenta carga negativa a pH 8,3 (Tampão de corrida: 100 mM Tris/Glicina pH 8,3).

3.2 Caracterização Enzimática da Protease Purificada

Vimos anteriormente que os sucessivos passos cromatográficos levaram à purificação de uma protease solúvel, com massa molecular aparente de 60 kDa. No entanto, torna-se necessário conhecer a especificidade desta protease, de modo a avaliar correctamente a sua função. Assim, para poder caracterizar a actividade proteolítica da protease purificada recorreu-se a dois tipos de ensaios: um ensaio enzimático que tem como intuito estimar qual o substrato preferencial da protease purificada, e outro que tem como objectivo identificar a classe da mesma.

Assim sendo, para estimar substrato preferencial da protease, as diferentes fracções de interesse resultantes dos passos de purificação (Ei, Mist EM, Mist TIQ, Mist Arg) foram incubadas com vários substratos acoplados à molécula fluorescente MCA (*4-Methyl-Coumaryl-7-Amide*). A utilização de todas estas amostras irá permitir avaliar se existe separação de outras proteases ao longo do processo de purificação. Isto será indicado pela variação na actividade com os vários substratos. A hidrólise dos substratos fluorescentes provoca a libertação do grupo MCA (Ex_{380nm} , Em_{460nm}) e o consequente aumento da fluorescência. Neste caso, a fluorescência foi monitorizada continuamente, sendo os resultados convertidos num gráfico de barras. Neste gráfico observa-se a actividade específica, quer do extracto concentrado de *Chenopodium sp*, quer das misturas resultantes do fraccionamento do mesmo (Figura 14).

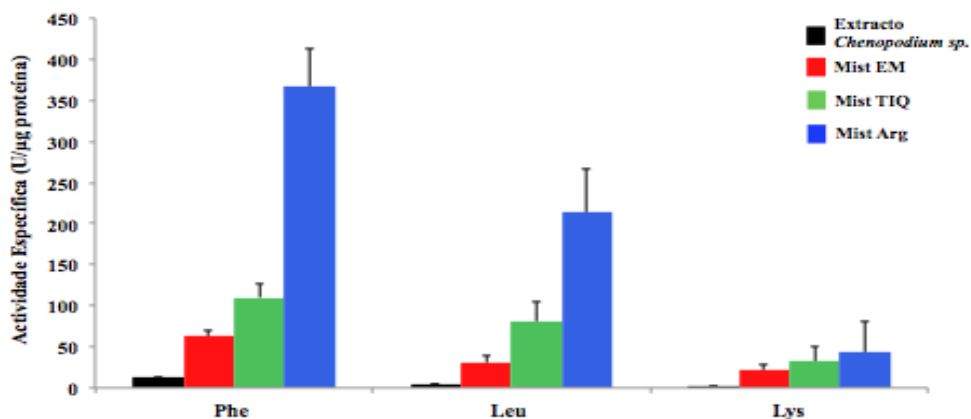


Figura 14 – Especificidade da protease purificada para diferentes substratos ao longo dos passos de fraccionamento. Para estes ensaios enzimáticos, foram utilizados cerca de 18 μg de extracto polínico, e entre 0,26 e 12 μg de fracções resultantes da purificação. Todos os ensaios foram realizados num volume final de 202 μL em tampão A, com 0,1 mM de Phe-MCA; Leu-MCA; Lys-MCA. Abreviaturas: Phe, fenilalanina; Leu, leucina; Lys, lisina. 1 Unidade de actividade = pmol MCA libertada/min. (n=4).

É importante mencionar, que para este estudo escolheram-se os três substratos que levaram a uma maior actividade proteolítica, nomeadamente Phe-MCA, Leu-MCA e Lys-MCA (Figura 14). No entanto também foram efectuados ensaios com outros substratos, como é o caso da Arg-MCA, Met-MCA, e Ala-MCA, Boc-VPR-MCA, Suc-LLVT-MCA, Gly-Pro-MCA, Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-MCA, Z-Gly-Pro-Arg-MCA, Ala-Pro-Ala-MCA e Ala-Ala-Pro-Phe-MCA.

Como podemos observar pela Figura 14, a protease purificada cliva preferencialmente péptidos pequenos, ocorrendo a clivagem mais eficiente do substrato Phe-MCA e Leu-MCA, e muito menos eficiente de Lys-MCA. Este resultados sugere que a protease prefere substratos com resíduos apolares no terminal amínico, do que substratos com resíduos polares. É também facilmente observável que, à medida que vão decorrendo os sucessivos passos de purificação, existe um aumento da actividade específica para com os vários substratos. Isto indica que ao longo do processo de purificação, vai diminuindo a quantidade total de proteína pelo que a protease consegue aceder mais facilmente ao substrato.

É importante referir que todos os ensaios enzimáticos foram realizados apenas a pH 7,4 e a 37 °C. Sendo assim, seria interessante variar estas condições, de modo a confirmar as condições para a actividade óptima da protease purificada. Para além disso, seria importante determinar a cinética da protease purificada para a hidrólise de diferentes substratos. Este estudo irá permitir uma caracterização mais completa sobre a especificidade desta enzima.

Após efectuados os ensaios anteriores, foram realizados ensaios de inibição enzimática para caracterizar melhor a actividade proteolítica da protease. Estes estudos de inibição permitem a classificação da enzima purificada, uma vez que são utilizados inibidores específicos para as diversas classes de proteases conhecidas: serínicas, cisteínicas, aspárticas e metaloproteinases. Neste estudo, foi estudado o perfil de inibição da Mist TIQ e da Mist Arg, uma vez que essas misturas apresentaram maior actividade específica. Este tipo de estudo também já foi realizado no extracto polínico de *Chenopodium sp.* (Gaspar, R., 2012). Assim, as diferentes amostras de interesse foram incubadas com os inibidores durante 10 minutos à temperatura ambiente, sendo depois adicionado o substrato preferencial (Phe-MCA). A fluorescência, tal como no ensaio anterior, foi monitorizada continuamente, sendo os resultados convertidos em gráficos de barras. Este gráfico é apresentado em termos de actividade residual relativa em comparação com uma situação controlo sem inibição (Figura 15).

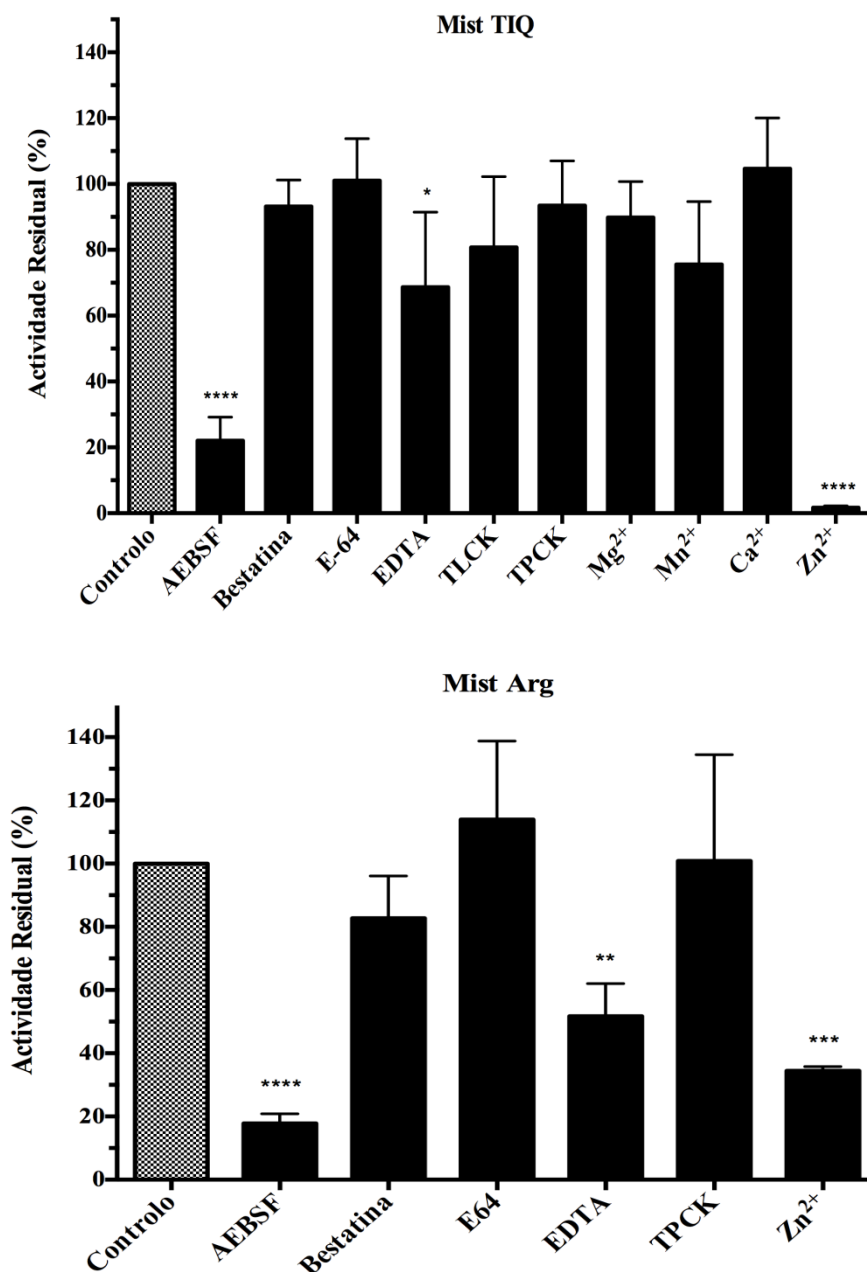


Figura 15 – Efeito de inibidores específicos na actividade proteolítica da protease purificada à partir do pólen de *Chenopodium sp.* Para estes ensaios, foram utilizados entre 0,26 e 12 µg de fracções resultantes da purificação (Mist TIQ e Mist Arg), sendo estas amostras previamente incubadas com os inibidores específicos, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Passado o tempo de incubação, foi adicionado 0,1 mM de Phe-MCA. Todos estes ensaios foram realizados num volume final de 202 µL em tampão A. Os resultados estão representados em actividade residual relativa em relação a uma condição controlo sem inibição e foram analisados estatisticamente usando o teste de Dunnet. **** P < 0.0001; ***P < 0.001; **P < 0,01; *P < 0.05 (n=4)

Como se pode observar na Figura 14, o perfil de inibição obtido na Mist TIQ e na Mist Arg é muito semelhante, havendo uma inibição prevalente de Zn^{2+} , AEBSF e EDTA. Estes resultados podem indicar a presença de uma ou mais proteases. O Zn^{2+} está envolvido no mecanismo de inibição de aminopeptidases (Nagata, H. *et al*, 2005; Cortes, L. *et al*, 2006;), enquanto que AEBSF é caracterizado por ser um inibidor irreversível geralmente descrito como específico para proteases serínicas. Este último inibidor, no entanto, também tem a capacidade de inibir aminopeptidases (Chandu, D. *et al.*, 2003; Cortes, L. *et al* 2006). É verdade que a Bestatina, um inibidor específico para aminopeptidases, não provocou qualquer inibição da actividade proteolítica da enzima, no entanto este inibidor actua de forma reversível, pelo que não se pode excluir a hipótese de existir este tipo de proteases. Por outro lado, o EDTA é um agente quelante que inibe metaloproteinases, indicando assim que um íão metálico pode estar envolvido na actividade enzimática. Tendo em conta estes resultados, tudo indica que a protease purificada apresenta maioritariamente actividade de metaloaminopeptidase. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de esta protease ser do tipo serínica ou até mesmo haver presença dos dois tipos de proteases. Este perfil de inibição é semelhante ao obtido anteriormente para o extracto polínico de *Chenopodium sp.* (Gaspar, R., 2012), o que pode indicar que a protease purificada é a principal responsável pela actividade enzimática obtida nesse extracto.

Para uma caracterização mais aprofundada da protease purificada seria importante utilizar uma maior diversidade de inibidores na Mist TIQ, ou até combinar vários inibidores específicos para as classes de proteases determinadas. Este estudo iria permitir averiguar se nesta amostra estamos ou não na presença de uma ou mais proteases. Mais relevante ainda seria determinar a sequência da protease por espectrometria de massa ou por degradação de Edman, o que iria possibilitar uma classificação mais específica e exacta da mesma.

Várias aminopeptidases e proteases serínicas foram descritas em pólenes, algumas delas com características semelhantes à protease purificada neste trabalho. Por exemplo no pólen de *Cryptomeria japonica* (cedro japonês), foi isolada e caracterizada uma aminopeptidase de 42 kDa, também ela com elevada especificidade

para o substrato Phe-MCA (Noguchi, Y. *et al*, 2002). O perfil de inibição desta protease também apresenta pontos comuns com o obtido neste trabalho. Isto é, apesar de ter sido inibida por Bestatina, a protease foi igualmente inibida por Zn^{2+} e EDTA (Nagata, H. *et al*, 2005), sugerindo que possui actividade de exopeptidase, mais especificamente de metaloaminopeptidase. Em *Parietaria judaica* foi purificada uma amino-peptidase N monomérica de 92 kDa (Cortes, L., 2006), a qual foi inibida por Bestatina, AEBSF, EDTA e Zn^{2+} , ou seja um perfil de inibição bastante parecido ao obtido com a nossa protease. Esta amino-peptidase apresenta muito semelhanças com outra descrita por Matheson e colaboradores no pólen de *Prosopis velutina* (Matheson, N. R. & J. Travis, 1998), nomeadamente a nível de peso molecular, perfil inibitório e sequencia interna. Em *Ambrosia artemisiifolia*, uma das causas principais de polinose na América do Norte, foram purificadas e caracterizadas duas proteases serínicas ambas com peso aproximadamente de 80 kDa, tendo uma delas uma grande preferência em clivar Phe na posição P1 (Bagarozzi D.A. *et al*, 1996; 1998). Em outros materiais alergénicos, nomeadamente *Penicillium citrinum* e *Periplaneta americana* também foram isoladas e caracterizadas proteases serínicas de 33 e 28 kDa (Su, N.Y. *et al*, 1999; Sudha, V.T. *et al*, 2008) respectivamente. Uma dessas proteases era inibida quer por AEBSF, quer por EDTA (Sudha, V.T. *et al*, 2008).

Todas as proteases purificadas e caracterizadas nesses estudos foram posteriormente testadas para a sua actividade na resposta alérgica. Algumas dessas proteases conseguiram, por exemplo, clivar moléculas importantes envolvidas na homeostase pulmonar (Bagarozzi D.A. *et al*, 1996; Matheson, N. R. & J. Travis, 1998, Cortes, L. *et al*, 2006;), aumentar a permeabilidade vascular e a inflamação (Bagarozzi D.A. *et al*, 1998), clivar proteínas constituintes das junções intercelulares (Cortes, L. *et al*, 2006;), ou ainda induzir uma expressão de mediadores pró-inflamatórios (Sudha, V.T. *et al*, 2008).

Temos então que, para além de purificar e caracterizar estas enzimas, é importante explorar o efeito das mesmas na resposta alérgica., com vista a futuras aplicações terapêuticas (Robinson, C. *et al*, 1997, Sudha, V.T. *et al*, 2008).

3.3 Efeito da Protease Purificada na Integridade de Células Epiteliais

A sensibilização aos alérgenos é um dos factores de risco que pode levar ao desenvolvimento de doenças alérgicas. Esta sensibilização implica a passagem dos alérgenos através da barreira epitelial respiratória, onde estes conseguem interagir directamente com as células dendríticas, levando assim a uma resposta alérgica. Vários estudos têm proposto que as proteases existentes em pólenes conseguem degradar proteínas constituintes das junções intercelulares, levando ao aumento da permeabilidade transepitelial e, conseqüentemente, facilitando o contacto entre o alérgeno e as células apresentadoras de antígeno em camadas subepiteliais (Hassim, Z. *et al*, 1998; Cortes, L. *et al*, 2006; Runswick, S. *et al.*, 2007).

Assim sendo, o passo seguinte deste trabalho consistiu em avaliar o efeito da protease purificada na integridade da barreira epitelial. Para isso foi estudada a permeabilidade transepitelial e, por imunodeteção, a potencial degradação de proteínas constituintes das junções intercelulares. Para estes estudos foram utilizadas duas linhas celulares adequadas, nomeadamente Calu-3 e MDCK.

3.3.1 Permeabilidade Transepitelial

Para a avaliação da permeabilidade celular utilizou-se a linha celular epitelial Calu-3, derivada de adenocarcinoma brônquico humano. Estas células são das poucas linhas celulares de vias aéreas que conseguem formar junções de oclusão funcionais *in vitro* e que apresentam resistência transepitelial elevada sendo por isso um bom modelo de barreira epitelial de vias aéreas. Para além disso, esta linha celular tornou-se a principal linha celular para estudos da permeabilidade transepitelial, pois conseguem produzir células humanas funcionais e diferenciadas (Cavet, M.E. *et al*, 1997). Neste tipo de células, as condições de cultura implementadas são importantes, uma vez que podem afectar as características da monocamada celular. Assim, para poder mimetizar ao máximo as condições nativas destas células (Grainger, C.I. *et al*, 2006), o crescimento das mesmas ocorreu numa interface ar-líquido.

A permeabilidade transepitelial foi medida pelo fluxo de FITC-Dex 70S, através da monocamada celular Calu 3, a qual foi crescida nos inserts das *transwells*. Essa

medição foi realizada em diferentes condições, que consistiram em 12 horas de estímulo com o extrato polínico e Mist TIQ, ambos na presença e ausência de 10 mM AEBSF. Inicialmente a experiência foi desenhada para aplicar a Mist Arg, uma vez que esta fracção contém a protease purificada. No entanto, as experiências não foram bem sucedidas, pelo que optou-se por usar a Mist TIQ. Esta amostra como já vimos apresenta a mesma actividade do que a Mist Arg e contém uma maior quantidade de proteína. Os resultados obtidos foram convertidos em gráficos de barras, onde se pode observar a permeabilidade da monocamada celular ao RITC-Dex 70S (Figura 16). Para além disso, esses resultados foram sujeitos a um estudo de comparação múltipla, sendo as varias situações comparadas relativamente aos controlos e entre si. Nessa experiência foi utilizado um controlo para cada situação: para estudar o extracto polínico o controlo consistiu na incubação das células com tampão A e para o estudo da Mist TIQ consistiu em tampão A com 0,2 M NaCl. Esta diferença nos controlos deve-se a Mist TIQ estar contida num tampão salino, uma vez que foi recolhida a meio da eluição salina na cromatografia de troca iónica (Figura 11).

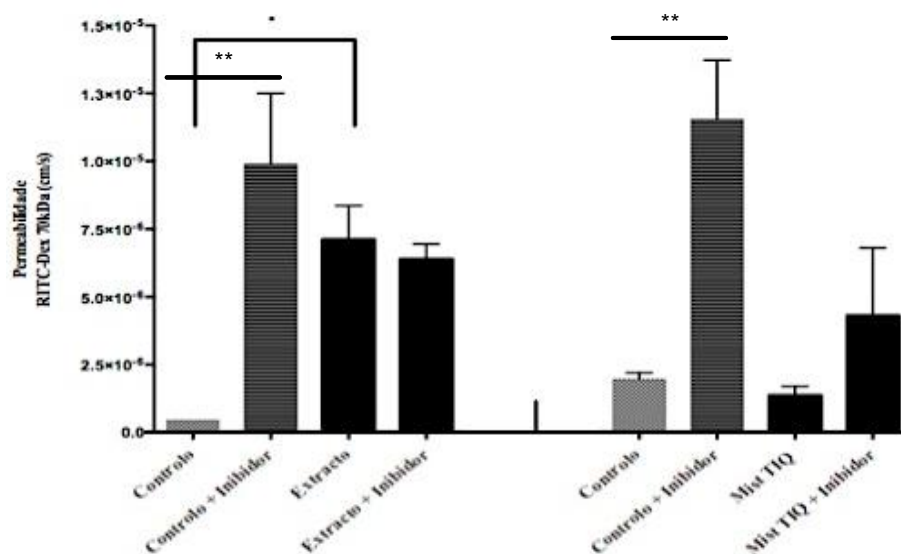


Figura 16 – Efeito do extracto polínico de *Chenopodium sp.* e da Mistura TIQ na permeabilidade de monocamadas celulares Calu-3. Para isso as células Calu-3 foram incubadas com as diferentes amostras, na presença e ausência de 10 mM AEBSF, durante 12 horas, a 37°C. O fluxo transepitelial foi medido nas 4 horas seguintes à incubação, sendo usado um composto com propriedade fluorescentes, RITC-Dex 70 S. Como controlos incubaram-se as células com tampão adequado às amostras em estudo, na presença e ausência de 10 mM AEBSF. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey. ***P<0.001; **P<0,01; *P<0.05 (n=2).

Pela análise da Figura 16 é possível ver que existe um aumento da permeabilidade transepitelial nas células Calu-3 incubadas com o inibidor AEBSF (Controlo +Inibidor). Este fenómeno ocorre nas duas situações em estudo (Extracto vs Mist TIQ), o que pode dever-se ao facto de ter sido utilizada uma concentração demasiado elevada deste inibidor, que pode ser citotóxica para as células. A concentração de AEBSF normalmente utilizada para este tipo de estudos não ultrapassa 1 mM (Vinhas, R. et al, 2011; Gaspar, R., 2012).

Além disso, a incubação das células com o extracto polínico de *Chenopodium sp.* também induziu um aumento da permeabilidade transepitelial, tal como tinha sido demonstrado em estudos anteriores (Gaspar, R., 2012) . Já a a Mist TIQ não provocou nenhum aumento da permeabilidade, pelo que a protease não interferiu com a integridade da barreira epitelial. Este último resultado, no entanto, pode dever-se aos ciclos de congelamento e descongelamento a qual a Mist TIQ foi sujeita, o que pode resultar numa perda de actividade proteolítica. Para além disso, a baixa quantidade de proteína aplicada nestes ensaios (8 µg) poderá ser outro factor limitante. Outra hipótese prende-se pelo facto de a protease poder exercer um efeito conjunto com outras moléculas presentes no extracto, que leva a apoptose e ao consequente aumento da permeabilidade. Ao longo do processo de purificação estas moléculas são eliminadas, não havendo um efeito significativo da protease na permeabilidade celular.

A incubação das células com o extracto ou a Mist TIQ na presença de AEBSF teve como intuito determinar se um eventual aumento da permeabilidade no extracto ou Mist TIQ estava relacionado com a protease purificada. No entanto, os resultados obtidos não são viáveis uma vez que o próprio controlo do inibidor induziu um aumento da permeabilidade devido à sua elevada concentração.

Assim, tendo em conta estes resultados não se conseguiu provar que o aumento da permeabilidade observado no extracto polínico de *Chenopodium sp.* resulta da actividade proteolítica da protease purificada.

3.3.2 Degradação de Proteínas das Junções Intercelulares

Como vimos na secção 3.3, tem sido proposto que as proteases conseguem degradar proteínas constituintes das junções intercelulares, o que pode levar ao aumento da permeabilidade celular, e portanto à fragilização da barreira epitelial.

Assim, para poder relacionar os efeitos observados na permeabilidade (Figura 16) com a potencial degradação de junções intercelulares foram preparados extractos celulares MDCK após exposição a diferentes estímulos: 6 horas com o extrato polínico na presença e ausência de 10 mM AEBSF; e 6 horas com a Mist TIQ na presença e ausência de AEBSF. Neste estudo foram utilizadas células MDCK, uma linha epitelial de rim canino, uma vez que possuem uma maior taxa de crescimento que as células Calu-3 e junções intercelulares funcionais e extensamente caracterizadas (Dukes, J.D. *et al*, 2011).

A avaliação do estado de degradação das TJ foi efectuada por imunodeteccção, através da marcação contra Claudina-1 (22 kDa) e Ocludina (65 kDa), proteínas transmembranares das TJ (Figura 3). Os resultados obtidos foram convertidos em gráficos de barras, onde se pode observar os níveis totais destas proteínas (Figura 17). Esses resultados foram sujeitos a um estudo de comparação múltipla, sendo as varias situações comparadas relativamente aos controlos (semelhantes ao descrito na secção 3.3.1) e entre si.

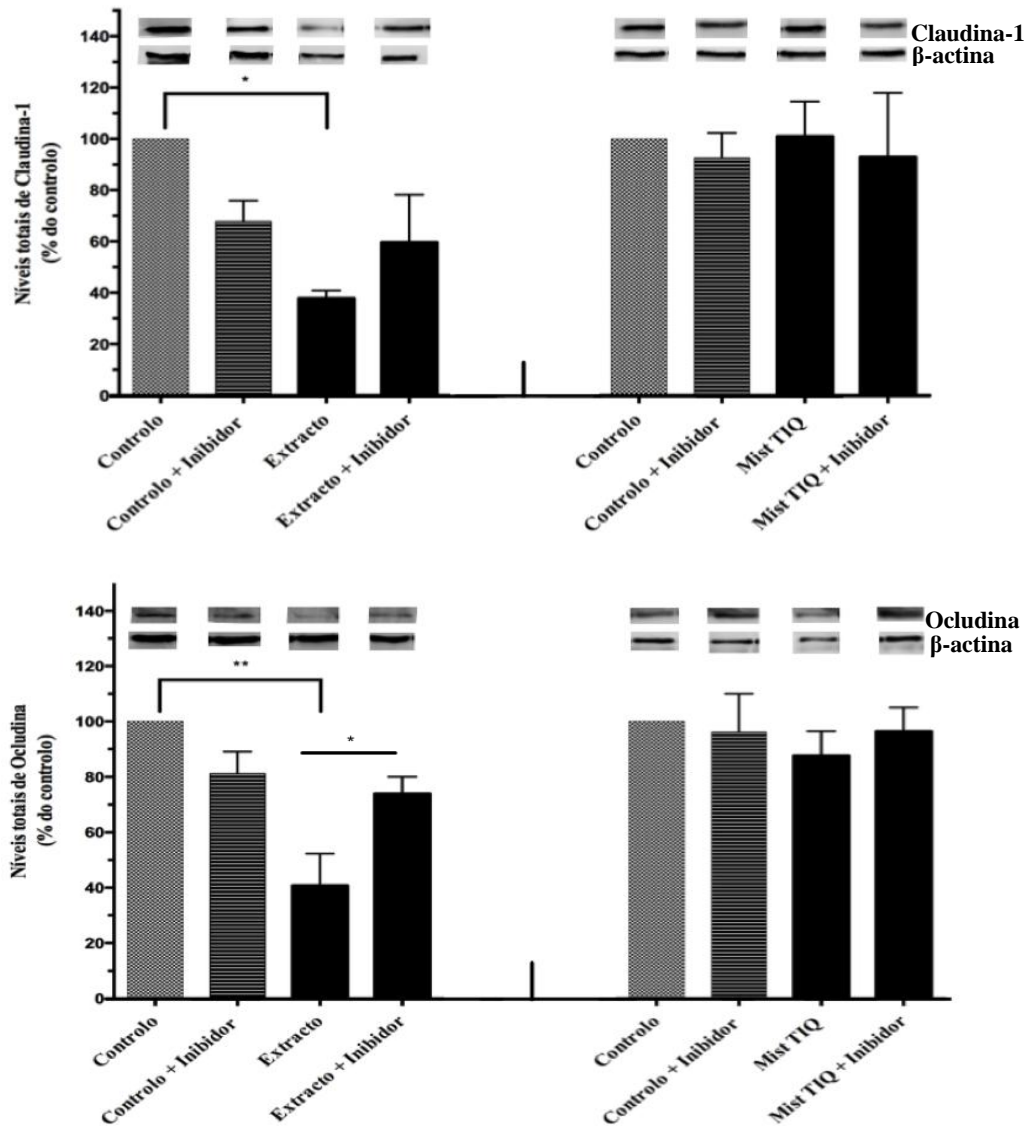


Figura 17 – Efeito do extracto polínico de *Chenopodium sp.* e da Mistura TIQ na degradação das TJ de células MDCK. As proteínas constituintes das TJ, Claudina-1 e Ocludina foram analisadas por imunodeteção, após 6 h de incubação com as diferentes amostras, na presença e ausência de 10 mM AEBSF. Como controlos incubaram-se as células com tampão adequado às amostras em estudo, na presença e ausência de 10 mM AEBSF. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey.***P<0.001; **P<0,01; *P<0.05 (n=2).

Como se pode observar na Figura 17, quer a Claudina-1, quer a Ocludina, foram degradadas após tratamento das células com o extracto polínico de *Chenopodium.sp.*, ocorrendo uma diminuição de aproximadamente 60 % das suas respectivas

quantidades. Este efeito foi parcialmente inibido na presença de AEBSF, o que indica que a degradação destas proteínas resulta de actividade proteolítica do tipo serínica ou de aminopeptidases (ver secção 3.2).

Infelizmente, a incubação da monocamada celular com a Mist TIQ não provocou uma diminuição significativa dos níveis de Claudina-1 e de Ocludina, o que indica que não ocorreu degradação destas proteínas por parte da protease purificada. Este resultado pode dever-se, tal como nos ensaios de permeabilidade transepitelial, à baixa quantidade de proteína aplicada nos estímulos (aproximadamente 8 µg) e aos ciclos de congelamento e descongelamento da Mist TIQ, que como já vimos anteriormente poder resultar numa perda de actividade proteolítica.

É interessante mencionar que todos estes resultados mostram, de forma evidente, a relação entre os efeitos observados na permeabilidade transepitelial e a degradação das proteínas das junções intercelulares. Ou seja, a degradação de proteínas das TJ, resultante do tratamento das células com o extracto polínico, pode levar a um aumento da permeabilidade transepitelial (Figura 16). Contrariamente, quando as células são incubadas com a Mist TIQ não ocorre degradação das junções, pelo que já não se observam alterações na permeabilidade.

É ainda importante salientar que o estado de degradação da proteína ZO-1 (220 kDa), pertencente aos complexos citosólicos das TJ, e da E caderina (120 kDa), proteína transmembranar das AJ, também foi avaliado. No entanto, a marcação contra estas proteínas não foi bem sucedida, pelo que os resultados não foram apresentados.

Assim, neste estudo não se conseguiu provar que a protease purificada é a principal responsável pela disrupção de junções intercelulares e pelo aumento da permeabilidade celular em *Chenopodium sp.* Contudo, continua a ser perceptível que a actividade proteolítica desempenha um papel nos efeitos observados neste extracto polínico (Gaspar, R., 2012). Nesse extracto, foi visto que a degradação de TJ pode envolver proteases do tipo serínicas ou aminopeptidases, uma vez que este efeito é revertido parcialmente pelo inibidor AEBSF. Varias proteases deste tipo demonstraram efeitos semelhantes à nível das junções intercelulares. Por exemplo a aminopeptidase N de *Parietaria judaica* demonstrou ser capaz de clivar proteínas das junções

intercelulares, nomeadamente, E-caderina e Ocludina, resultando num elevado nível de descolamento celular em linhas de células epiteliais pulmonares (Cortes, L., 2006). Para além disso essa protease foi ainda capaz de clivar SP e VIP, moléculas envolvidas na regulação do tónus broncomotor (Stanisz, A. *et al*, 1988; Barnes, P.J., 1991). No fungo *Penicillium chrysogenum*, uma protease serínica foi responsável pela clivagem de TJ, e por induzir uma resposta pró inflamatória em células epiteliais (Tai, H.Y. *et al*, 2006).

É lógico que todas as proteases já identificadas e estudadas, tanto em pólenes como em outros materiais alergénicos, envolvem mecanismos de acção para além da degradação de TJ e do aumento da permeabilidade celular (ver secção 1.4). Assim, seria relevante estudar o efeito da protease purificada em alguns desses mecanismos.

Capítulo 4

Conclusões e Perspectivas

4. Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras

Com este trabalho foi possível, através de sucessivos passos cromatográficos, purificar parcialmente uma protease do pólen *Chenopodium sp.* Esta protease apresenta um peso molecular de cerca de 60 kDa e um pI ácido. O perfil de inibição obtido indica que a protease purificada apresenta maioritariamente actividade de metaloaminopeptidase. A avaliação da actividade da protease para hidrólise de diferentes substratos-MCA mostra que prefere substratos com resíduos hidrofóbicos no terminal amínico.

Este estudo conseguiu demonstrar mais uma vez que o extracto polínico de *Chenopodium sp.* contém proteases envolvidas na degradação de proteínas constituintes das TJ (Claudina-1 e Ocludina), o que resulta num aumento da permeabilidade celular. Isto sugere que as proteases contidas neste pólen poderão estar envolvidas no aumento da permeabilidade do epitélio pulmonar aos componentes alérgicos. Por outro lado, a protease purificada não foi capaz de degradar as TJ nem induzir um aumento da permeabilidade celular. Tal facto pode dever-se à baixa quantidade de proteína resultante do processo de purificação, que poderá ser insuficiente para causar uma resposta a nível celular. Além disso, este resultado pode demonstrar que o aumento da permeabilidade observado no extracto polínico pode dever-se a um efeito conjunto com outras proteínas existentes nesse extracto, que levam a apoptose e consequentemente a um aumento da permeabilidade transepitelial.

Com base nos resultados obtidos, são sugeridas algumas perspectivas quanto a estudos futuros:

- ✓ Para determinar com mais rigor a classe proteolítica da protease purificada, será importante determinar a sequência de aminoácidos da protease purificada e verificar se possui alguma homologia com outras proteases conhecidas. Este estudo poderá ser realizado através de técnicas de espectrometria de massa ou degradação de Edman.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- ✓ Através do conhecimento da estrutura primária, será possível clonar a protease e posteriormente produzir-la na forma recombinante. Isto permitirá obter maiores quantidades de proteínas, que como já vimos pode ser um facto limitante para estudos *in vitro*
- ✓ Será interessante determinar as condições óptimas para a actividade desta enzima (Temperatura e pH), e a sua preferência para diferentes substratos (determinação dos parâmetros cinéticos)
- ✓ Será relevante estudar o efeito da protease em outros mecanismos envolvidos no desenvolvimento de doenças alérgicas. Uma das hipóteses será avaliar se a protease purificada consegue activar receptores PAR-2, uma vez que estes receptores participam na inflamação do pulmão. Uma outra hipótese consistirá em estudar a acção da protease na clivagem de neuropeptídeos importantes para a homeostase pulmonar, nomeadamente SP e VIP e angiotensina. Por fim será interessante ver se inibidores endógenos como SLPI e α 1-PI, conseguem inibir a protease.

Referências Bibliográficas

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. (2007).** Cellular and molecular immunology, 6th edition, Saunders Elsevier.
- Adam, E., Hansen, K. K., Astudillo, O. F., Coulon, L., Bex, F., Duhant, X., Jaumotte, E., Hollenberg, M. D. & Jacquet, A. (2006).** The House Dust Mite Allergen Der p 1, Unlike Der p 3, Stimulates the Expression of Interleukin-8 in Human Airway Epithelial Cells via a Proteinase-activated Receptor-2-independent Mechanism. *J Biol Chem* **281**, 6910-6923.
- Anderson, J. M. & Van Itallie, C. M. (1995).** Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **269**, G467-475.
- Antony, A. B., Tepper, R. S., and Mohammed, K. A. (2002).** Cockroach extract antigen increases bronchial airway epithelial permeability," *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **110**, 589–595.
- Arizmendi, N. G., Abel, M., Mihara, K. (2011).** Mucosal allergic sensitization to cockroach allergens is dependent on proteinase activity and proteinase-activated receptor-2-activation. *Journal of Immunology* **5**, 3164–3172.
- Asokanathan, N., Graham, P. T., Stewart, D. J., Bakker, A. J., Eidne, K. A., Thompson, P. J. & Stewart, G. A. (2002).** House Dust Mite Allergens Induce Proinflammatory Cytokines from Respiratory Epithelial Cells: The Cysteine Protease Allergen, Der p 1, Activates Protease-Activated Receptor (PAR)-2 and Inactivates PAR-1. *J Immunol* **169**, 4572-4578.
- Bagarozzi, D. A., Jr., Pike, R., Potempa, J. & Travis, J. (1996).** Purification and Characterization of a Novel Endopeptidase in Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) Pollen. *J Biol Chem* **271**, 26227-26232.
- Bagarozzi, D. A., Jr., J. Potempa, et al. (1998).** Purification and characterization of an arginine-specific peptidase from ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**(3): 363-369.
- Baker, S.F., Yin, Y., Runswick, S.K., Stewart, G.A., Thompson, P.J., Garrod, D.R., Robinson, C. (2003).** Peptidase allergen Der p 1 initiates apoptosis of epithelial cells independently of tight junction proteolysis. *Mol Membr Biol* **20**, 71–81.
- Barderas R, Villalba M, Lombardero M and Rodríguez R. (2002).** Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; **127**(1):47-54.
- Barnes P. J. (1991).** Neurogenic inflammation in airways. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* **94** (1-4):303-9.
- Barret, A. (1998)** Handbook of Proteolytic Enzymes , *Academic Press, London*.
- Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A. (2010).** The dual role of Zonula Occludens (ZO) proteins. *Jornal of Biomedicine and Biotechnology.* **vol. 2010, Article ID 402593**, 11 pages.
- Bhat, R. K., Page, K., Tan A., and Hershenson, M. B. (2003).** German cockroach extract increases bronchial epithelial cell interleukin-8 expression. *Clinical & Experimental Allergy* **33**, 35–42.

- Borger, P., Koëter, G. H., Timmerman, J.A., Vellenga, E., Tomee, J.F., Kauffman, H.F. (1999).** Proteases from *Aspergillus fumigatus* Induce Interleukin (IL)-6 and IL-8 Production in Airway Epithelial Cell Lines by Transcriptional Mechanisms. *The Journal of Infectious Diseases* **180**(4): 1267-1274.
- Bousquet, J. van Cauwenberge, P., Khaltaev, N. & others (2008).** Allergic rhinitis and its impact on asthma, *J Allergy and Clinical Immunology* **63**, 8-160.
- Brown A, Farmer, MacDonald L, Sallenave J-M. (2003).** House Dust Mite Der p 1 downregulates defenses of the lung by inactivating elastase inhibitors. *Am. J. Respir. Cell Moll. Biol.* **29**:381-389.
- Breeze, R. G. & Wheeldon, E. B. (1977).** The cells of the pulmonary airways. *Am Rev Respir Dis* **116**, 705-777.
- Burge, H. A. & Rogers, C. A. (2000).** Outdoor allergens. *Environ Health Perspect* **108 Suppl 4**, 653-659.
- Cascio, W. E., Yang, H., Muller-Borer, B. J. & Johnson, T. A. (2005).** Ischemia-induced arrhythmia: the role of connexins, gap junctions, and attendant changes in impulse propagation. *J Electrocardiol* **38**, 55-59.
- Cavet, M.E., West, M., Simmons, N.L. (1997).** Transepithelial Transport of the Fluoroquinolone Ciprofloxacin by Human Airway Epithelial Calu-3 Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 2693-2698
- Chandu, D., Kumar, A. & Nandi, D. (2003).** PepN, the Major Suc-LLVY-AMC-hydrolyzing Enzyme in *Escherichia coli*, Displays Functional Similarity with Downstream Processing Enzymes in Archaea and Eukarya. IMPLICATIONS IN CYTOSOLIC PROTEIN DEGRADATION. *J Biol Chem* **278**, 5548-5556.
- Chiu, L. L., Perng, D. W., Yu, C. H., Su, S. N., and Chow, L. P. (2007).** Mold allergen, Pen c 13, induces IL-8 expression in human airway epithelial cells by activating protease-activated receptor 1 and 2. *Journal of Immunology* **178**, 5237-5244.
- Chou, H., Tam, M. F., Lee, L.H., Chiang, C.H., Tai, H.Y., Panzani, R.C., Shen, H.D. (2008).** Vacuolar serine protease is a major allergen of *Cladosporium cladosporioides*. *International Archives of Allergy and Immunology* **146**, 277-286.
- Cocks, T. M., Moffatt, J. D. (2001).** Protease-activated Receptor-2 (PAR2) in the airways. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* (2001) **14**, 183-191.
- Cortes, L. (2006).** Pj-peptidase, uma nova aminopeptidase N do pólen de *Parietaria judaica*: efeito na integridade e na função do epitélio pulmonar. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Cortes, L., Carvalho, A. L., Todo-Bom, A., Faro, C., Pires, E. & Verissimo, P. (2006).** Purification of a novel aminopeptidase from the pollen of *Parietaria judaica* that alters epithelial integrity and degrades neuropeptides. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 878-884

- Coyne, C. B., Gambling, T. M., Boucher, R. C., Carson, J. L. & Johnson, L. G. (2003).** Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L1166-1178.
- D'Amato, G., Ruffilli, A., Sacerdoti, G. & Bonini, S. (1992).** Parietaria pollinosis: a review. *Allergy* **47**, 443-449.
- D'Amato, G. & Liccardi, G. (1994).** Pollen-related allergy in the European Mediterranean area. *Clin Exp Allergy* **24**, 210-219.
- Deb, R., Shakib, F., Reid, K., and Clark, H. (2007).** Major house dust mite allergens *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 and *Dermatophagoides farinae* 1 degrade and inactivate lung surfactant proteins A and D. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 36808–36819.
- Denburg, J. A. (1990).** Cytokine-induced human basophil/mast cell growth and differentiation in vitro. *Springer Semin Immunopathol* **12**, 401-414.
- Denker, B. M. & Nigam, S. K. (1998).** Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am J Physiol Renal Physiol* **274**, F1-9.
- Donnelly, Sheila, Dalton, John P. and Loukas, Alex (2006).** Proteases in Helminth- and Allergen- Induced Inflammatory Responses. *Chem Immunol Allergy*. Basel, Karger, 2006, vol 90, pp 45-64.
- Dukes, J.D., Whitley P., Chalmers, A.D. (2011),** The MDCK variety pack: choosing the right strain, *BMC Cell Biology* **12**:43
- Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A. & Anderson, J. M. (1998).** The Tight Junction Protein ZO-1 Establishes a Link between the Transmembrane Protein Occludin and the Actin Cytoskeleton. *J Biol Chem* **273**, 29745-29753.
- Fanning, A. S., Mitic, L. L. & Anderson, J. M. (1999).** Transmembrane Proteins in the Tight
- Forbes, L. R. and Haczku, A. (2010).** SP-D and regulation of the pulmonary innate immune system in allergic airway changes," *Clinical and Experimental Allergy* **40**, 547–562.
- Förster, C. (2008),** Tight junctions and the modulation of barrier function in disease, *Histochemistry and Cell Biology* **130**, 55-70.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. & Tsukita, S. (1998).** Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin. *J Cell Biol* **141**, 1539-1550.
- Gadermaier G, Dedic A, Obermeyer G, Frank S, Himly M, Ferreira F. (2004).** Biology of Weed Pollen Allergens. *Current Allergy and Asthma Reports* 2004; **4**: 391–400.
- Gaspar, R. (2012).** Pollen proteases and allergic disorders. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Goldsby, R., Kindt, T. & Osborne, B. (2000).** Kuby immunology.(Goldsby, Kindt & Osborne, Beds) 4th edition, 397-409. W.H. *Freeman and Company* N.Y.

- Grainger, C.I., Greenwell, L.L, Lockley, D.J, Martin, G.P., Forbes B. (2006).** Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of airway epithelial barrier. *Pharm Res* 2006;**23**:1482-1490.
- Grobe, K., Becker, W. M., Schlaak, M. & Petersen, A. (1999).** Grass group I allergens (beta-expansins) are novel, papain-related proteinases. *Eur J Biochem* **263**, 33-40.
- Grote, M., Vik, H. & Elsayed, S. (1988).** Immuno-electronmicroscopic identification and localization of the antigenic proteins of tree pollen grains. *Allergy* **43**, 603-613.
- Gunawan, H., Takai, T., Ikeda, S., Okumura, K. & Ogawa, H. (2008).** Protease activity of allergenic pollen of cedar, cypress, juniper, birch and ragweed. *Allergol Int* **57**, 83-91.
- Hassim, Z., Maronese, S. E. & Kumar, R. K. (1998).** Injury to murine airway epithelial cells by pollen enzymes. *Thorax* **53**, 368-371.
- Hewitt, C. R. A, Brown, A. P., Hart, B. J., and Pritchard, D. I.(1995).** A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. *Journal of Experimental Medicine* **182**, 1537–1544.
- Hivrale, V. K., Chougule, N. P., Chhabda, P. J., Giri, A. P., and Kachole ,M. S. (2005).** Unraveling biochemical properties of cockroach (*Periplaneta americana*) proteinases with a gel Xray film contact print method. *Comparative Biochemistry and Physiology B* **141**, 261–266.
- Holgate, S. T., Lackie, P. M., Davies, D. E., Roche, W. R. & Walls, A. F. (2000).** The bronchial epithelium as a key regulator of airway inflammation and remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy* **29 Suppl 2**, 90-95.
- Hong, J. H., Lee, S. I., Kim, K. E. (2004).** German cockroach extract activates protease-activated receptor 2 in human airway epithelial cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**, 315–319.
- Ibrahim, A. R., S. Kawamoto, et al. (2010).** Molecular cloning and immunochemical characterization of a novel major Japanese cedar pollen allergen belonging to the aspartic protease family. *Int Arch Allergy Immunol* **152**(3): 207-218.
- Kalsheker, N.A., Deam, S., Chambers, L., Sreedharan, S., Brocklehurst, K., Lomas, D.A. (1996).** The house dust mite allergen Der p1 catalytically inactivates alpha 1-antitrypsin by specific reactive centre loop cleavage: a mechanism that promotes airway inflammation and asthma. *Biochem Biophys Res Commun* **221**(1): 59-61.
- Kato, Atsushi and Schleimer, Robert P. (2008).** Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol.* 2007; **19**(6): 711-720.
- Kay, A. B. (2001).** Allergy and Allergic Diseases- First of Two Parts. *N Engl J Med* **344**, 30-37.
- Kauffman, H. F., Tomee, J. F., van de Riet, M. A., Timmerman, A. J. & Borger, P. (2000).** Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* **105**, 1185-1193.

- Kikuchi, Y., Takai, T., Kuhara, T. et al (2006).** Crucial commitment of proteolytic activity of a purified recombinant major house dust mite allergen der p1 to sensitization toward IgE and IgG responses. *Journal of Immunology* **177**, 1609–1617.
- King, C., Brennan, S., Thompson, P.J., Stewart, G.A. (1998).** Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. *J Immunol* **161**(7): 3645-3651.
- Knight DA, Lim S, Scaffidi AK, Roche N, Chung KF, Stewart GA, and Thompson PJ (2001).** Proteinase-activated receptors in human airways: upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* **108**: 797-803.
- Knox, R. B. & Heslop-Harrison, J. (1970).** Pollen-Wall Proteins: Localization and Enzymic Activity. *J Cell Sci* **6**, 1-27.
- Kondo, S., Helin, H., Shichijo, M., and Bacon, K. B. (2004).** Cockroach allergen extract stimulates protease-activated receptor-2 (PAR-2) expressed in mouse lung fibroblast. *Inflammation Research* **53**, 489–496.
- Kukreja, N., Sridhara, S., Singh, B. P., and Arora, N. (2008).** Effect of proteolytic activity of *Epicoccum purpurascens* major allergen, Epi p 1 in allergic inflammation. *Clinical and Experimental Immunology* **154**, 162–171.
- Kurup, V. P., Xia, J. Q., Shen, H. D. et al (2002).** Alkaline serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* has synergistic effects on Asp-f-2-induced immune response in mice. *International Archives of Allergy and Immunology* **129**, 129–137.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lee, K. E., Kim, J.W., Jeong, K. Y., Kim, K. E., Yong, T. S., and Sohn, M. H. (2007).** Regulation of German cockroach extract-induced IL-8 expression in human airway epithelial cells *Clinical and Experimental Allergy* **37**, 1364–1373.
- Lee, M. F., Wang, N. M., Liu, S. W., Lin, S. J., and Chen, Y. H. (2010).** Induction of interleukin 8 by American cockroach allergens from human airway epithelial cells via extracellular signal regulatory kinase and jun N-terminal kinase but not p38 mitogen-activated protein kinase. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* **105**, 234–240.
- Malech, H. L. & Gallin, J. I. (1987).** Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* **317**, 687-694.
- Manchenko, G.P. (2002)** Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels, Second Edition. CRC Press.
- Maruo, K., Akaike, T., Matsumura, Y., Kohhmoto, S., Inada, Y., Ono, T., Arao, T., and Maeda, H. (1991).** Triggering of the vascular permeability reaction by activation of the Hageman factor-prekallikrein. *Biochim Biophys Acta* vol **1074**, 62–68.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M. & other authors (1998).** Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration. *J Cell Biol* **142**, 117-127.

- Matsumura, Y. (2012)**, Role of Allergen Source-Derived Proteases in Sensitization via Airway Epithelial Cells, *Journal of Allergy* **2012**, 1-11
- Matheson, N. R. & J. Travis (1998)**. Purification and characterization of a novel peptidase (Ilmes) from mesquite (*Prosopis velutina*) pollen. *J Biol Chem* **273**(27): 16771-16777.
- Matter, K. & Balda, M. S. (2003)**. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 225-236.
- Matthiesen, F., Ipsen, H. & Lowenstein, H. (1991)**. Pollen Allergens In: D'Amato G., Spiekma F., Bonini S. (Eds): *Allergenic Pollen and Pollinosis in Europe*, 36-44. Blackwell Scientific Publications, London.
- McFadden, E. R. & Gilbert, I. A. (1992)**. Asthma. *N Engl J Med* **327**, 1928-1937.
- Nagata, H., Takei, T., Kojima, R., Kodera, Y., Nishimura, H., Inada Y., Matsushima, A. (2005)**. Characteristics of an aminopeptidase from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J Agric Food Chem* **53**, 5445-5448.
- Noguchi, Y., Nagata, H., Koganei, H., Kodera, Y., Hiroto, M., Nishimura, H., Inada, Y., Matsushima, A. (2002)**. Isolation and characterization of aminopeptidase (Jc-peptidase) from Japanese cedar pollen (*Cryptomeria japonica*). *J. Agric. Food Chem* **50**, 3540-3543.
- Nouri HR, Sankian M, Vahedi F, Afsharzadeh D, Rouzbeh L, Moghadam M, Varasteh A. (2011)**. Diagnosis of *Chenopodium album* allergy with a cocktail of recombinant allergens as a tool for component-resolved diagnosis. *Mol Biol Rep*. 2011.
- Page, K., Strunk, V. S., and Hershenson, M. B. (2003)**. Cockroach proteases increase IL-8 expression in human bronchial epithelial cells via activation of protease-activated receptor (PAR)-2 and extracellular-signal-regulated kinase," *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **112**, 1112–1118.
- Page, K., Hughes, V. S., Odoms, K. K., Dunsmore, K. E., Hershenson, M. B. (2005)**. German cockroach proteases regulate interleukin-8 expression via nuclear factor for interleukin-6 in human bronchial epithelial cells. *American Journal of Allergy Respiratory Cell and Molecular Biology* **32**, 225–231.
- Pauli G. (2000)**. Evolution in the understanding of cross-reactivities of respiratory allergens: the role of recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; **123**(3):183-95.
- Plotkowski, M. C., Bajolet-Laudinat, O. & Puchelle, E. (1993)**. Cellular and molecular mechanisms of bacterial adhesion to respiratory mucosa. *Eur Respir J* **6**, 903-916.
- Pomés, A., Chapman, M. D., Vailes, L. D., Blundell, T. L., and Dhanaraj, V. (2002)**. Cockroach allergen Bla g 2: structure, function, and implications for allergic sensitization. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **165**, 391–397.
- Radlowski, M., Kalinowski, A., Adamczyk, J., Królikowski, Z., Bartkowiak, S. (1996)**. Proteolytic activity in the maize pollen wall. *Physiol Plant* **98**, 172–178.

- Raftery, M. J., Saldanha, R. G., Geczy, C. L. & Kumar, R. K. (2003).** Mass spectrometric analysis of electrophoretically separated allergens and proteases in grass pollen diffusates. *Respir Res* **4**, 10.
- Reed, C. E. & Kita, H. (2004).** The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 997-1008; quiz 1009.
- Reichard, U., Monod, M., Ruchel, R. (1995).** Molecular cloning and sequencing of the gene encoding an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* **130**, 69–74.
- Robinson, B. W. S., Venaille, T. J., Mendis, A. H. W., and McAleer, R. (1990).** Allergens as proteases: an *Aspergillus fumigatus* proteinase directly induces human epithelial cell detachment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **86**, 726–731.
- Robinson, C., Kalsheker, N.A., Srinivasan, N., King, C.M., Garrod, D.R., Thompson, P.J., Stewart, G.A. (1997).** On the potential significance of the enzymatic activity of mite allergens to immunogenicity. Clues to structure and function revealed by molecular characterization. *Clin Exp Allergy* **27**,10-21
- Roche, N., Chinet, T.C., Huchon, GJ. (1997).** Allergic and nonallergic interactions between house dust mite allergens and airway mucosa. *Eur Respir J* **10**, 719–726.
- Roche N, Stirling RG, Lim S, Oliver BG, Oates T, Jazrawi E, et al. (2003).** Effect of acute and chronic inflammatory stimuli on expression of protease-activated receptors 1 and 2 in alveolar macrophages. *J Allergy Clin Immunol* 2003;**111**:367-73.
- Rodriguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Gonzalez, E. M., Monsalve, R. I., Huecas, S., Tejera, M. L. & Ledesma, A. (2002).** Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy* **57 Suppl 71**, 6-16.
- Runswick, S., Mitchell, T., Davies, P., Robinson, C. & Garrod, D. R. (2007).** Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions. *Respirology* **12**, 834-842.
- Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T. & Tsukita, S. (1998).** Occludin-deficient Embryonic Stem Cells Can Differentiate into Polarized Epithelial Cells Bearing Tight Junctions. *J Cell Biol* **141**, 397-408.
- Sakata Y, Arima K, Takai T, Sakurai W, Masumoto K, Yuyama N, Sumaninami Y, Kishi F, Yamashita T, Kato T, Ogawa H, Fujimoto K, Matsuo Y, Sugita Y, Izuhara K. (2004).** The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p 1. *J Biol Chem* 2004;**279**:5081-5087.
- Schmidlin, F., S. Amadesi, K. Dabbagh, D. E. Lewis, P. Knott, N. W. Bunnett, P. R. Gater, P. Geppetti, C. Bertrand, and M. E. Stevens (2002).** Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. *J. Immunol.* **169**:5315-5321.
- Schneeberger, E. E., Walters, D. V. & Olver, R. E. (1978).** Development of intercellular junctions in the pulmonary epithelium of the foetal lamb. *J Cell Sci* **32**, 307-324.

- Schulz, O., Laing, P., Sewell, H.F., Shakib, F. (1995).** Der p I, a major allergen of the house dust mite, proteolytically cleaves the low-affinity receptor for human IgE (CD23). *Eur J Immunol* **25**(11): 3191-3194.
- Schulz, O., Sutton, B.J., Beavil, R.L., Shi, J., Sewell, H.F., Gould, H.J., Laing, P., Shakib, F. (1997).** Cleavage of the low-affinity receptor for human IgE (CD23) by a mite cysteine protease: nature of the cleaved fragment in relation to the structure and function of CD23. *Eur J Immunol* **27**, 584–588.
- Schulz, O., Sewell, H. F., and Shakib, F. (1998).** A sensitive fluorescent assay for measuring the cysteine protease activity of Der p 1, a major allergen from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Journal of Clinical Pathology* **51**, 222–224.
- Schwab, C. J., Cooley, J. D., Brasel, T., Jumper, C. A., Graham, S. C., and Straus, D. C. (2003).** Characterization of exposure to low levels of viable *Penicillium chrysogenum* conidia and allergic sensitization induced by a protease allergen extract from viable *P. chrysogenum* conidia in mice. *International Archives of Allergy and Immunology* **130**, 200–208.
- Schwab, C. J., Cooley, J. D., Jumper, C. J., Graham, S. C., and Straus, D. C. (2004).** Allergic inflammation induced by a *Penicillium chrysogenum* conidia-associated allergen extract in a murine model. *Allergy* **59**, 758–765.
- Shen, H.D., Tam, M. F., Tang, R. B., and Chou, H. (2007).** Aspergillus and penicillium allergens: focus on proteases. *Current Allergy and Asthma Reports* **7**, 351–356.
- Stanisz A., Scicchitano R, Bienenstock J. (1988).** The role of vasoactive intestinal peptide and other neuropeptides in the regulation of the immune response *in vitro* and *in vivo*. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;**527**:478-85.
- Su, N. Y., Yu, C. J., Shen, H. D., Pan, F. M., and Chow, L. P. (1999).** Pen c 1, a novel enzymic allergen protein from *penicillium citrinum*. Purification, characterization, cloning and expression. *European Journal of Biochemistry* **261**, 115–123.
- Sudha, V. T., Srivastava, D., Arora, N., Gaur, S. N., and Singh, B. P. (2007).** Stability of protease-rich *periplaneta americana* allergen extract during storage: formulating preservatives to enhance shelf life. *Journal of Clinical Immunology* **27**, 294–301.
- Sudha, V. T., Arora, N., Gaur, S. N., Pasha, S., and Singh, B. P. (2008).** Identification of a serine protease as a major allergen (Per a 10) of *periplaneta Americana*. *Allergy* **63**, 768–776.
- Sudha, V. T., Arora, N., and Singh, B. P. (2009).** Serine protease activity of per a 10 augments allergen-induced airway inflammation in a mouse model. *European Journal of Clinical Investigation* **39**, 507–516.
- Sun, G., M. A. Stacey, Schmidt, M., Mori, L., Mattoli, S. (2001).** Interaction of Mite Allergens Der P3 and Der P9 with Protease-Activated Receptor-2 Expressed by Lung Epithelial Cells. *J Immunol* **167**(2): 1014-1021.
- Tai, H. Y., Tam, M. F., Chou, H., Peng, H. J., Su, S. N., Perng, D. W. & Shen, H. D. (2006).** Pen ch 13 allergen induces secretion of mediators and degradation of occludin protein of human lung epithelial cells. *Allergy* **61**, 382-388.

- Tai, H. Y., Tam, M. F., Chou, H., Perng, D. W., and Shen, H. D. (2010).** Pen ch 13 major fungal allergen decreases CD44 expression in human bronchial epithelial cells. *International Archives of Allergy and Immunology* **153**, 367–371.
- Takai, T., Kato, T., Yasueda, H., Okumura, K., Ogawa, H. (2005)** Analysis of the structure and allergenicity of recombinant pro- and mature Der p 1 and Der f 1: major conformational IgE-epitopes blocked by prodomains. *J Allergy Clin Immunol* **115**:555–563
- Taverna, S., Flugy, A., Colomba, P., Barranca, M., De Leo, G. & Alessandro, R. (2008).** Effects of *Parietaria judaica* pollen extract on human microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **372**, 644-649.
- Thomas, W.R., Smith, W.A., Hales, B.J., Mills, K.L., and O'Brien, R.M. (2002).** Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *International Archives of Allergy and Immunology* **129**, 1-18.
- Thompson, A. B., Robbins, R. A., Romberger, D. J., Sisson, J. H., Spurzem, J. R., Teschler, H. & Rennard, S. I. (1995).** Immunological functions of the pulmonary epithelium. *Eur Respir J* **8**, 127-149.
- Thompson, P. J. (1998).** Unique role of allergens and the epithelium in asthma. *Clin Exp Allergy* **28 Suppl 5**, 110-116; discussion 117-118.
- Tomee, J.F.C., van Weissenbruch, R., de Monchy, J.G., Kauffman, H.F. (1998).** Interactions between inhalant allergen extracts and airway epithelial cells: Effect on cytokine production and cell detachment. *The Journal of allergy and clinical immunology* **102**(1): 75-85.
- Traidl-Hoffmann, C., Kasche, A., Jakob, T. (2002).** Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes. *J. Allergy Clin. Immunol* **109**, 831-838.
- Tsukita, S., Furuse, M. & Itoh, M. (2001).** Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 285-293.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Senczuk, A.M., Kita, Y., Arakawa, T. (2007)** Effects of salts on protein-surface interactions: applications for column chromatography. *J Pharm Sci.* **96**(7):1677-90.
- Valenta R and Niederberger V. (2007):** Recombinant allergens for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* **119**:826-830.
- van Ree, R., Voitenko, V., van Leeuwen, W. A. & Aalberse, R. C. (1992).** Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. *Int Arch Allergy Immunol* **98**, 97-104.
- Vermeer, P. D., Denker, J., Estin, M. (2009).** MMP9 modulates tight junction integrity and cell viability in human airway epithelia. *American Journal of Physiology* **5**, 751–762.
- Vinhas R, Cortes L, Cardoso I, Mendes VM, Manadas B, Todo-Bom A, Pires E, Veríssimo P. (2011).** Pollen proteases compromise the airway epithelial barrier through degradation of transmembrane adhesion proteins and lung bioactive peptides. *Allergy* **2011**; **66**(8):1088-98.

- Wada, K., Matsuwaki, Y., Yoon, J. (2010).** Inflammatory responses of human eosinophils to cockroach are mediated through protease-dependent pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **126**, 169–172,.
- Wada, K., Matsuwaki, Y., Moriyama, H., Kita, H. (2011).** Cockroach induces inflammatory responses through protease-dependent pathways. *International Archives of Allergy and Immunology* **155**, 135–141.
- Wan, H., Winton, H.L., Soeller, C., Tovey E.R., Gruenert, D.C., Thompson P.J., Stewart G.A., Taylor G.W., Garrod D.R., Cannell M.B., and Robinson C. (1999).** Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* **104**, 123-133.
- Wan, H., Winton, H.L., Soeller, C., Taylor, G.W., Gruenert, D.C., Thompson, P.J., Cannell, M.B., Stewart, G.A., Garrod, D.R., Robinson, C. (2001).** The transmembrane protein occludin of epithelial tight junctions is a functional target for serine peptidases from faecal pellets of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* **31**, 279-294.
- Wang, J. Y. and Reid, K. B. M. (2007).** The immunoregulatory roles of lung surfactant collectins SP-A, and SP-D, in allergen-induced airway inflammation. *Immunobiology* **212**, 417–425,.
- Widmer, F., Hayes, P. J., Whittaker, R. G. & Kumar, R. K. (2000).** Substrate preference profiles of proteases released by allergenic pollens. *Clin Exp Allergy* **30**, 571-576.
- Winton, H. L., Wan, H., Cannell, M. B., Gruenert, D. C., Thompson, P. J., Garrod, D. R., Stewart, G. A. & Robinson, C. (1998).** Cell lines of pulmonary and non-pulmonary origin as tools to study the effects of house dust mite proteinases on the regulation of epithelial permeability. *Clin Exp Allergy* **28**, 1273-1285.
- Wunschmann, S., Gustchina, A., Chapman, M. D., and Pomés, A. (2005).** Cockroach allergen Bla g 2: an unusual aspartic proteinase. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **116**, 140–145.
- Ying, S., Zhang, G., Gu, S. & Zhao, J. (2006).** How much do we know about atopic asthma: where are we now? *Cell Mol Immunol* **3**, 321-332.
- Zhang, X., Wang, Y., Lv, X., Sun, P., Lu, H., Li, F. (2009).** NtCP56, a new cysteine protease in *Nicotiana tabacum* L., involved in pollen grain development. *J. Of Experimental Botany* **6**, 1569-1577.

Referências de Internet:

www.bio-rad.com
 www.infovisual.info
 www.rpaerobiologia.com
 www.spaic.pt
 proteincrystallography.org