

EFEITO DE RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE EPÍTOPOS LINEARES E CONFORMACIONAIS DA GLIADINA

Clédson Calixto de Oliveira (1), Antonio Fernando de Melo Vaz (2).

(1) Universidade Federal de Campina Grande, cludsonoliveira16@gmail.com

(2) Universidade Federal de Campina Grande, antonio.melo@ufcg.edu.br

RESUMO: O glúten é uma proteína amorfa composta pela mistura de cadeias protéicas longas de gliadina e glutenina. Estudos sobre limitar ou eliminar a alergenicidade de alimentos tem sido constantemente avaliados com irradiação ionizante. O objetivo deste trabalho foi investigar e caracterizar o efeito da irradiação gama sobre a estrutura molecular da gliadina com a finalidade de limitar a antigenicidade do glúten em cereais. A purificação foi realizada através de cromatografia de troca iônica em CM-Celulose. SDS-PAGE e Eletroforese Bidimensional (2-DE) associada com Espectrometria de Massa (MALDI-TOF/TOF) foram empregadas na identidade das sequências protéicas das gliadinas e dos efeitos da irradiação sobre suas estruturas primárias. A identificação das isoformas das gliadina (α/β , γ e ω) mostrou-se complexa sendo a eletroforese bidimensional e o MALDI TOF MS/MS técnicas ineficientes. O efeito de ampla faixa de dose de radiação gama sobre a estrutura terciária das gliadinas do glúten de trigo foi avaliada por espectrometria de fluorescência. Para as medições de fluorescência intrínseca do triptofano e tirosina, a excitação foi a 295 e 280 nm, respectivamente, e a emissão foi mensurada 305-450 nm. Mudanças na fluorescência intrínseca foram observadas com aumento da dose de radiação. Na dose de 1 kGy, as gliadinas, possivelmente, desdobraram-se em estados não nativos que são propensos a agregação confirmada pelo deslocamento espectral do centro de massa. Por conseguinte, conclui-se que a radiação altera a estrutura terciária da proteína que induz a agregação indetectáveis através de métodos tradicionais, tais como o SDS-PAGE.

Palavras-chave: Glúten, Alergia, Irradiação gama.

INTRODUÇÃO

O glúten é uma proteína amorfa composta pela mistura de cadeias protéicas longas de gliadina e glutenina. Estas proteínas são classificadas como Prolaminas, compostos de gliadinas monoméricos e gluteninas poliméricos (WAGA, 2004). Gliadina elastomérica e grupos de proteínas gluteninas interagem, formando a matriz de glúten visco elástica com propriedades que contribuem diretamente para qualidade de produtos de panificação.

O glúten é um exemplo de uma substância cuja utilizável característica é combinada com propriedades que são prejudiciais para a saúde. Devido suas proteínas, especialmente as gliadinas que são importantes alérgenos alimentares. Suas propriedades específicas causam dois tipos de reações alimentares indesejáveis ao glúten. O primeiro inclui alergias mediadas por IgE, como asma, dermatite atópica, urticária, angioedema, alergia alimentar ou anafilática, a qual constitui um risco mortal (VARJONEN et al., 2000; BURK et al., 2001; VISSERS et al., 2001). Em segundo, estas proteínas podem agravar a doença celíaca, doença inflamatória da mucosa do intestino delgado (duodeno e jejuno) em

indivíduos geneticamente susceptíveis causada pela ingestão de proteínas do glúten (SCHERF; KOEHLER; WIESER, 2015).

A modificação estrutural de proteínas dos alimentos por irradiação tem sido observada e recentemente, várias pesquisas atestaram que a profunda modificação na estrutura molecular de fatores antinutricionais após irradiação gama reduziria a alergenicidade em modelos experimentais in vivo.

Neste contexto, nosso trabalho avaliou como a radiação gama ionizante, um alternativo método de processamento alimentar, compromete a estrutura molecular de alérgenos alimentares protéicos. Ao analisar a viabilidade da irradiação gama como uma ferramenta na atenuação da alergenicidade de alérgenos protéicos criamos oportunidades para o desenvolvimento de um valioso método para o processamento de alimentos imunogênicos.

METODOLOGIA

Isolamento da Gliadina

O isolamento da gliadina foi realizado a partir da dissolução de grãos triturados de trigo em solução de NaCl 1,0 M. Ao precipitado, após centrifugação, foi adicionada solução etanólica 70% (v/v). O sobrenadante após centrifugação foi liofilizado obtendo-se a gliadina. A concentração protéica foi mensurada segundo Lowry et al. (1951), utilizando uma curva padrão de BSA.

Purificação de Gliadinas

A purificação foi realizada através de cromatografia de troca iônica em CM-Celulose. Para as frações α/β e γ -gliadinas foi utilizado tampão Acetato de glicina 10 mM, pH 4,6 em ureia 3 M com um gradiente linear de 0-250 mM de NaCl. Para preparação do tampão acetato glicina em 3M de ureia a 200mM (usado para diluir a CM-Celulose) foi utilizado 7,4g de ácido acético, 15g de glicina, 5,8g de Hidróxido de Sódio. O tampão foi transformado de 200mM para 10mM (50ml do tampão acetato glicina mais 950 ml do tampão 3M de ureia).

Para a ω -gliadina, o tampão Acetato de sódio 5 mM, pH 3,5 em ureia 1 M com gradiente de 5-100 mM de NaCl foi usado. Para preparação do tampão foi utilizado 16,46g de acetato de sódio diluído em 1000 ml do tampão de ureia a 1M. O pH obtido do tampão foi aproximadamente 4,6; ajustar o pH para 3,5 utilizando ácido acético puro. Após a preparação do tampão o mesmo foi convertido de 200 mM para 5 mM (25ml de do tampão na

concentração inicial mais 975mL do tampão a 1M de ureia).

Para preparação da coluna de CM-Celulose foi utilizado 15mL do gel mais 5mL da solução contendo a proteína diluída no tampão de corrida com uma concentração de 20mg/mL de proteína. Para purificação das frações α/β e γ -gliadinas foi utilizada uma coluna com volume de 10mL; para a ω -gliadina uma coluna de 20mL de volume foi utilizada. Após o empacotamento do gel o mesmo foi lavado com o tampão de corrida específico para cada fração de proteína, a quantidade de tampão que foi utilizado para lavar o gel foi em média o triplo do volume da coluna.

Na purificação das frações de α/β e γ -gliadinas foi utilizado um gradiente linear de 0-250 mM de NaCl, para a ω -gliadinas utilizou-se um gradiente linear de 5-100 mM de NaCl. As amostras após passarem pela coluna cromatográfica foram coletadas com um fluxo de 2mL em 6 minutos.

Irradiação gama das Gliadinas

As alíquotas liofilizadas em ácido acético 0,01 M de α/β , γ e ω gliadinas foram irradiadas em atmosfera de oxigênio a temperatura ambiente numa câmara panorâmica do irradiador de raio gama Cobalto 60 (Gammacell 220 Excel, Ontario, Canadá) no Laboratório de Metrologia do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco (Recife-PE). As doses absorvidas foram 5, 10, 15, 25 e 35 Gy (doses baixas. Taxa de dose = 2,345 Gy/h) e 1, 3 e 9 kGy (doses médias. Taxa de dose = 3,032 kGy/h).

Eletroforese – SDS-PAGE

1°-Gel de separação: 12% de acrilamida, tampão tris-HCl.

Em um Erlenmeyer de 25ml, foi misturado a solução a 30% de acrilamida mais 0,8% de bisacrilamida, 4x tris HCl/SDS (pH 8,8) e água Mili-Q. Adicionar 10% de Persulfato de Amônia (APS) e TEMED. Imediatamente misturar o volume gentilmente. 4 ml (30% de acrilamida / 8% de bisacrilamida; 2,5ml Tris HCl/SDS; 3,5ml de H₂O; 100 micro litros de Persulfato de amônia (polimerizador); 20 micro litros de TEMED.

2°-Gel de Empacotamento: 3,9% de acrilamida).

Em um Erlenmeyer de 25 ml foi misturado 0,65ml de acrilamida 30% / 8% de bisacrilamida com 1,25ml de Tris / HCl SDS 4x (pH 6,8) e 3,05ml de H₂O destilada ou Mili-Q. Adicionar 25 micro litros de 10% de APS e 5 micro litros de TEMED. Misturar o volume gentilmente (uso imediato). 0,975ml de acrilamida 30% / 0,8% de bisacrilamida; 1,875ml de

Tris HCl; 4,875ml de H₂O; 37,5 micro litros de APS; 7,5 micro litros de TEMED.

Foi utilizado como tampão de corrida o Tris Glicina (pH 8,5). Tris 6g; Glicina 28,8g; 1g de SDS; 1 litro de água destilada. Foi utilizado em média 500ml de tampão. Voltagem-120; corrente-40; tempo-80 minutos. Como pré-corante (fixador), foi utilizado o ácido Tricloroacético a 20% - 10g. Corante Cromassie - 1,25g; 50ml de H₂O; 40ml de Metanol; 10ml de ácido Acético.

Eletroforese bidimensional – 2D

O equivalente a 1 mg das gliadinas foram precipitado com ácido tricloroacético e ressolubilizados em tampão de reidratação. A focalização foi realizada em gradiente de pH imobilizado 3-10. As fitas IPG foram reidratadas no aparato para a focalização isoeletrica IPGphor 3, GE Healthcare, durante 14 horas a 20°C. Depois da focalização isoeletrica, as fitas IPG foram lavadas com ddH₂O, equilibradas em duas soluções redutoras de pontes de dissulfetos segundo Görg et al. (1995). A segunda dimensão da eletroforese foi feita em um gel vertical homogêneo de acrilamida 12,5% conforme descrito por Laemmli (1970). A separação eletroforética das proteínas foi feita a 10°C, em cuba Hoefer SE 600 Ruby (Amersham Bioscience). Após a eletroforese, as proteínas foram coradas com Azul de comassie. Os géis foram então digitalizados usando-se um scanner Image Scanner (Amersham Biosciences), Em seguida foram analisadas usando-se o programa computacional Image Master Platinum v.6 (Amersham Biosciences).

Espectrometria de massa e identificação de proteínas – MALDI-TOF/TOF

As proteínas (spots) detectadas foram retiradas dos géis, para a digestão trípica. A partir dos peptídeos gerados pela digestão dos spots, as amostras de interesse foram selecionadas e analisadas em espectrômetro de massa do tipo Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time OfFlight (MALDI TOF/TOF – Ultraflex III, Bruker Daltonics, Billerica, MA-USA) a fim de determinar as massas moleculares. O espectro MS/MS foi confrontado com um banco de dados NCBI (atualizado em 14 de janeiro de 2015) pelo programa Mascot v. 2.3 (Matrix Science Ltd., London, UK).

Espectrometria de Fluorescência

O efeito de ampla faixa de dose de radiação gama sobre a estrutura terciária das gliadinas do glúten de trigo foi avaliada por espectrometria de fluorescência já que os efeitos diretos e indiretos da radiação podem produzir oxidação de cadeias laterais de aminoácidos, bem como a fragmentação da cadeia polipeptídica o que provoca alterações na estrutura proteica.

Após a irradiação, a intensidade de emissão de fluorescência do triptofano e da tirosina de gliadinas foi medida a 25°C numa cubeta de quartzo retangular em um espectrofluorímetro. Para as medições de fluorescência intrínseca do triptofano e tirosina, a excitação foi a 295 e 280 nm, respectivamente, e a emissão foi mensurada 305-450 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento das gliadinas a partir da farinha de glúten através da precipitação em solução salina, solubilização em solução alcoólica e cromatografia em CM-celulose foram eficientes em isolar as frações da gliadina.

No entanto, ao analisar através de SDS-PAGE o perfil protéico das gliadinas, verificamos a presença de várias bandas polipeptídicas nas amostras isoladas a partir da cromatografia em CM-celulose (Figura 1). O padrão eletroforético das proteínas do glúten e de suas subunidades são complexos com grande número de componentes, diferentemente das glutaninas (BIETZ, 1992). Esta complexidade pode ser atribuída a presença de dois ou três pares de cromossomos homólogos em trigo selvagem (*durum*) e domesticado, respectivamente, e ao polimorfismo adicional relacionado à mutação em genes da proteína do glúten o que produz muitas isoformas proteicas (PAYNE, 1987).

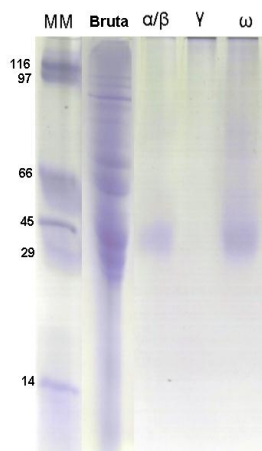


Figura 1 – SDS-PAGE da gliadina bruta e frações isoladas por CM-celulose.

A eletroforese bidimensional (2D) a qual apresenta uma melhor qualidade na separação de isoformas protéicas foi utilizada. Através da eletroforese bidimensional foram identificadas 14 bandas protéicas (spots) conforme demonstrado na figura 2 A e B.

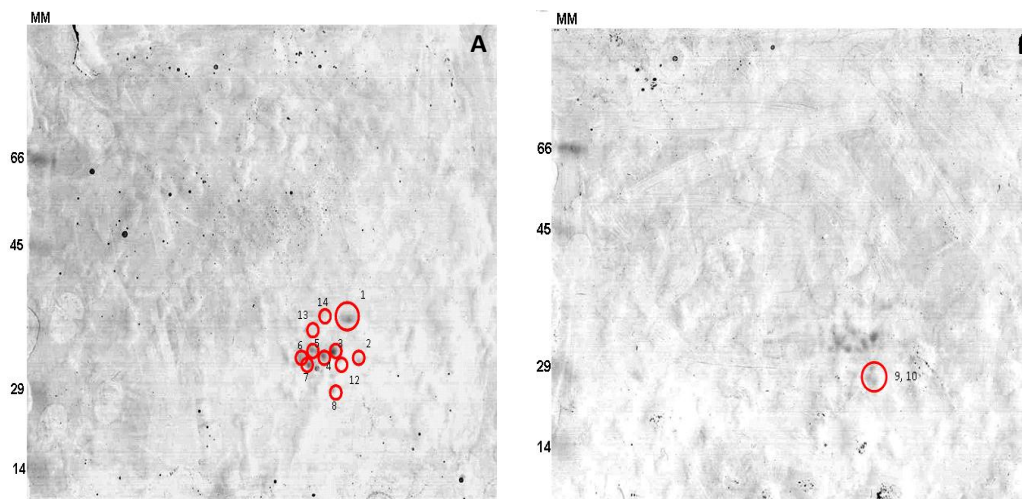


Figura 2– Eletroforese bidimensional das frações isoladas por CM-celulose.(A) α/β e γ -gliadinas isoladas em CM-celulose (B) Purificação de ω -gliadinas isoladas em CM-celulose

Os 14 spots (bandas protéicas) identificados foram submetidos à digestão tríplica e os peptídeos produzidos foram analisados por espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF) para obtenção do perfil de fragmentação e posterior identidade protéica. A eletroforese bidimensional é uma excelente ferramenta para separação de proteínas homólogas e isoformas, entretanto, pequenas alterações na sequência primária de proteínas que não alterem significativamente seu perfil de carga líquida e massa molecular podem ser responsáveis por inadequada separação.

A análise do perfil de fragmentação de massa dos spots revelaram ser duvidosos o que reforça o resultado ineficiente da eletroforese bidimensional em realizar uma adequada separação das isoformas.

As gliadinas foram irradiadas em baixas e médias doses de radiação gama. As gliadinas irradiadas em baixa doses (entre 5 e 35 Gy) não demonstraram mudança estrutural aparente, desde que manteve o mesmo massa molecular das gliadinas não irradiadas em SDS-PAGE (Figura 3; B-F). Vaz et al., (2010) verificou que baixas doses de radiação não produziram fragmentação da estrutura primária de uma proteína. No entanto, alterações na estrutura terciária que poderia comprometer sua atividade e solubilidade já podem ser detectadas.

A inicial degradação das gliadinas foi observada com doses de 3 kGy (Figura 3; G-I). A degradação das bandas principais foi detectada acima de 6 kGy, indicando que a agregação observada no gel de empacotamento foi composta de fragmento de polipeptídeos. Puchala, Schuessler (1995) demonstraram que o ponto de ruptura causado por irradiação pode ocorrer em frágeis ligações na cadeia polipeptídica. Proteínas podem ser convertidas em agregados de alto peso molecular devido a geração de reações de ligação cruzadas entre proteínas, interações hidrofóbicas e eletrostáticas como também na formação de pontes de dissulfeto (OLIVEIRA et al., 2006; XU, CHANCE, 2005). Assim, uma variedade de condições pode induzir desnaturação com subsequente precipitação em forma insolúveis agregados amorfos ou estrutura intermediárias com ausência de função específica (VAZ et al. 2010).

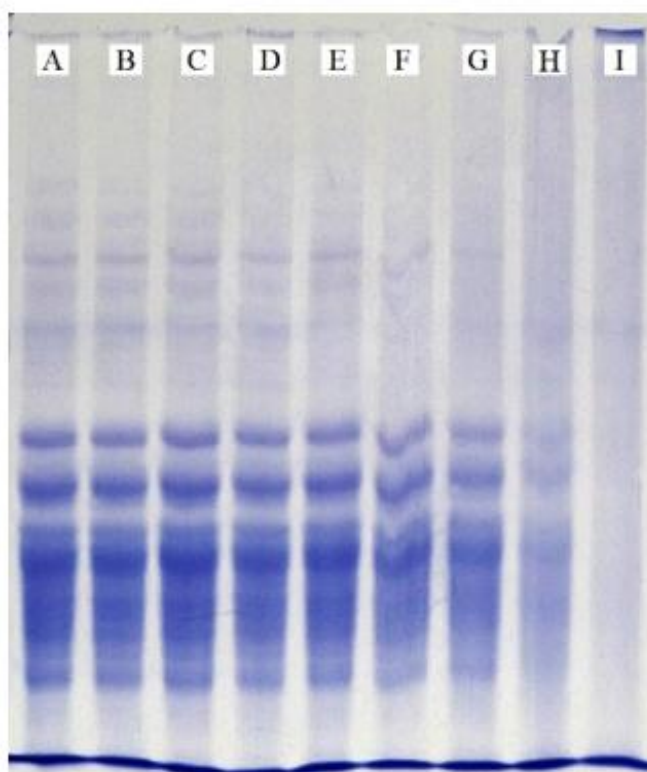


Figura 3: Gliadinas irradiadas em SDS-PAGE. A) Não irradiada; B) 5 Gy; C) 10 Gy; D) 15 Gy; E) 25 Gy; F) 35 Gy; G) 1 kGy; H) 3 kGy; I) 9 kGy.

Mudanças na fluorescência intrínseca foram observadas com aumento da dose de radiação. Em uma dose de 1 kGy, as gliadinas, possivelmente, desdobraram-se em estados não nativos que são propensos a agregação confirmada pelo deslocamento espectral do centro de massa. Por conseguinte, conclui-se que a radiação altera a estrutura terciária da proteína que induz a

agregação indetectáveis através de métodos tradicionais, tais como o SDS-PAGE.

CONCLUSÃO

O isolamento das gliadinas demonstrou relativa facilidade no que tange a separação de outras frações proteicas do glúten. No entanto, a identificação proteica das isoformas dos diversos grupos de gliadina (α/β , γ e ω) mostrou-se complexa já que a eletroforese bidimensional e o MALDI TOF MS/MS que a priori seria a ferramenta ideal para identidade das sequências foi falha.

Por fim, a irradiação demonstrou efetividade em abolir a estrutura das gliadinas ao provocar fragmentação e agregação. No entanto ainda precisamos verificar qual o impacto da radiação gama sobre os epítomos responsáveis pela antigenicidade ao glúten.

REFERÊNCIAS

BÜRK, K et al. Effectiveness of intravenous immunoglobulin therapy in cerebellar ataxia associated with gluten sensitivity. **Ann Neurol**, v. 50, p. 827-828, 2001.

BIETZ, J. A.; SIMPSON, D. G. Electrophoresis and Chromatography of Wheat Proteins: Available Methods and Procedures for Statistical Evaluation of the Data. **J. Chromatogr**, v. 624, p. 53–80, 1992.

GÖRG, A.; BOGUTH, G.; OBERMAIER, C.; POSCH, A.; WEISS, W. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. **Electrophoresis**. v. 16 p. 1079-86, 1995.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LOWRY, O. H, J. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J BiolChem**; 193: 265, 1951.

OLIVEIRA, C. L. P. et al.,. Effects of gamma radiation on b-lactoglobulin: Oligomerization and aggregation. **Biopolymers**, v. 85, p. 284–294, 2006.

PAYNE, P. I. Genetics of Wheat Storage Proteins and the Effect of Allelic Variation on Bread-Making Quality. **Ann. Rev.PlantPhysiol**, v. 38, p. 141–153, 1987.

PUCHALA, M.; SCHUESSLER, H. Oxygen effect in the radiolysis of proteins. IV. Myoglobin. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 46, p. 326–332, 1995.

SCHERF, K. A.; KOEHLER, P.; WIESER, H. Gluten and Wheat Sensitivities – an Overview. **Journal of Cereal Science**, v. 30, p. 1-10, 2015.

VARJONEN, E.; VAINIO, E.; KALIMO, K. Antigliadin IgE – indicator of wheat allergy in atopic dermatitis. **Allergy**, v. 55, p. 386-391, 2000.

VAZ, A. F.M. et al., Gamma irradiation as an alternative treatment to abolish allergenicity of lectins in food. **Food Chem**, v. 124, p. 1289-1295, 2010.

VISSERS, M.; DOEKES, G.; HEEDERIK, D. Exposure to wheat allergen and fungal α -amylase in the homes of bakers. **ClinExp Allergy**, v. 31, p. 1577-1582, 2001.

WAGA, J. Structure and allergenicity of wheat gluten proteins – a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 13, n. 4, p. 327–338, 2004.

XU, G.; CHANCE, M. R. Radiolytic modification of sulfur-containing amino acid residues in model peptides: Fundamental studies for protein footprinting. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 2437–2449, 2005.