



WESTERN BLOTTING: A TÉCNICA E APLICAÇÕES NA PESQUISA E ROTINA DIAGNÓSTICA EM MEDICINA VETERINÁRIA

Marina Pacheco Miguel¹, Liliana Borges de Menezes², Eugênio Gonçalves de Araújo³

1. Professora Doutora de Patologia Geral do Curso de Biomedicina, *Campus* Jataí, Universidade Federal de Goiás (UFG). Coordenação do Curso de Biomedicina, Unidade Jatobá, *Campus* Jataí, Universidade Federal de Goiás, BR 364, Km 192, Parque Industrial, CEP: 75801-458, Jataí, GO, Brasil. (mapa_mi@hotmail.com)
2. Professora Doutora de Patologia Geral, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, UFG
3. Professor Doutor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia, UFG

Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012

RESUMO

Os avanços na biologia molecular têm contribuído significativamente para o entendimento da etiopatogênese das doenças. Proteínas realizam diferentes funções no organismo e são responsáveis por manter sua homeostase. Mudanças em sua composição podem desencadear processos patológicos, sendo de grande importância, a aplicação de métodos moleculares para identificação de marcadores de doenças. À partir do desenvolvimento da eletroforese em gel vários estudos foram conduzidos a fim de permitir a imunodeteção de diferentes proteínas. O advento da técnica de *Western blotting*, na década de 70, possibilitou que proteínas separadas pela eletroforese fossem detectadas, caracterizadas e quantificadas. Este método determinou grande avanço no estudo de diversas enfermidades animais, principalmente por se tratar de um exame de alta sensibilidade e especificidade, além de ser um método de rápida execução, precisão e acessível aos laboratórios de pesquisa e de serviço de rotina diagnóstica. Esta abordagem tem por objetivo revisar a técnica e apontar possibilidades de aplicação da técnica de *Western blotting* para pesquisas e diagnóstico de agentes infecciosos em medicina veterinária, sendo esta uma área em que os pesquisadores estão profundamente envolvidos.

PALAVRAS-CHAVE: biologia molecular, imunodeteção, *protein blotting*, proteínas.

WESTERN BLOTTING: THE TECHNIQUE AND APPLICATIONS ON THE RESEARCH AND DIAGNOSTIC ROUTINE IN VETERINARY MEDICINE

ABSTRACT

Advances in molecular biology have contributed significantly to understanding the genesis of diseases. The proteins perform different functions in the body and are responsible for maintaining homeostasis. Changes in composition can trigger pathological processes, so the application of molecular methods to identify disease markers is of great importance. Various studies were conducted to allow immunodetection of the different proteins since of the development of gel electrophoresis. The advent of the Western blotting technique, in the 70s, allow detection, characterization and quantified of the proteins by electrophoresis. This method determined breakthrough in the study of various animal diseases, primarily because it is a test of high sensitivity and specificity, and is a fast method of execution, accuracy and accessible to research labs and diagnostic routine service. This approach aims to review the WB technical and of application possibilities for research and diagnosis of infectious agents in veterinary medicine, an area where researchers are deeply involved.

KEYWORDS: imunodetección, molecular biology, *protein blotting*, proteins

INTRODUÇÃO

A separação de diferentes proteínas pela eletroforese passou a ser realizada no início do século 20. A eletroforese em gel envolve a migração de partículas, em um determinado gel, de acordo com seu tamanho e carga elétrica (PAGANO, 1999). A utilidade desta técnica era limitada pelo fato de que as proteínas separadas presentes em uma matriz gelatinosa eram de difícil acesso para provas moleculares. A partir do advento do procedimento que permitia a transferência destas proteínas para uma membrana adsorvente, esta limitação foi sanada (KURIEN & SCOFIELD, 2003). Desde o início, em 1979, o protocolo para transferência de proteínas de um gel de eletroforese para membrana tem evoluído grandemente (KURIEN & SCOFIELD, 2006).

De acordo com alguns autores, a técnica de *Western blotting* (WB) iniciou uma nova era no imunodiagnóstico, o qual reduziu significativamente as reações cruzadas que podiam ser encontradas em outras técnicas moleculares de diagnóstico. Este método foi inicialmente usado como teste de diagnóstico de infecções virais e bacterianas e mais tarde foi empregado no campo da parasitologia (SARIMEHMETOÚLU, 2002).

Esta revisão tem por objetivo revisar a técnica e apontar possibilidades de aplicação da técnica de *Western blotting* para pesquisas e diagnóstico de agentes infecciosos em medicina veterinária.

A TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING

Western blotting (WB) também conhecido como *protein blotting* ou *immunoblotting*, é um poderoso e importante método em biologia molecular utilizado para imunodeteção de proteínas após a separação destas por eletroforese em gel e transferência para membrana adsorvente (KURIEN & SCOFIELD, 2006). Esta técnica permite detectar, caracterizar e quantificar múltiplas proteínas,

principalmente aquelas que estão em baixas quantidades em determinada amostra (KURIEN & SCOLFIELD, 2003).

WB evoluiu da técnica de DNA (*Southern blotting*) e RNA (*Northern blotting*). A denominação WB ao procedimento modificado superficialmente a partir da técnica proposta por Towbin e seus colaboradores, e foi dada a fim de manter a denominação geográfica tradicional destes métodos, iniciado pelo *Southern blotting* (KURIEN & SCOLFIELD, 2003; 2006).

A técnica de WB oferece as seguintes vantagens: membranas úmidas são maleáveis e de fácil manuseio; as proteínas imobilizadas na membrana são rapidamente e uniformemente acessíveis a diferentes ligantes; somente uma pequena quantidade de reagentes são necessários para a análise de transferência; é possível fazer múltiplas réplicas do gel; o armazenamento da amostra transferida pode ser prolongado, antes de ser usada e a mesma proteína transferida pode ser usada para múltiplas análises sucessivas (KURIEN & SCOFIELD, 2006). Além disso, em estudos relacionados à detecção de anticorpos e proteínas de agentes infecciosos, este método é considerado altamente sensível e específico, sendo o método de eleição para diagnóstico de inúmeras doenças dos animais (COOLEY *et al.*, 2001; TALMI-FRANK *et al.*, 2006).

Desde seu início, *protein blotting* tem evoluído constantemente e agora a comunidade cientista está diante de múltiplos caminhos e significados da transferência e detecção de proteínas. O protocolo básico de WB pode ser resumido nos seguintes passos: preparação das amostras e fracionamento de proteínas, execução da eletroforese em gel, transferência das proteínas separadas do gel para uma membrana adsorvente, bloqueio de ligações inespecíficas, adição de anticorpo específico e detecção da reação.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E FRACIONAMENTO PROTÉICO

A preparação de amostras é um dos passos cruciais do processo de separação de proteínas. Os resultados do experimento dependem das condições iniciais do material. Por esse motivo, um modelo experimental adequado e uma preparação cuidadosa de amostras são essenciais para se obter resultados significativos e confiáveis, particularmente em estudos comparativos de proteínas, em que normalmente existem diferenças mínimas entre as amostras experimentais e as do grupo controle (FREEMAN & HEMBY, 2004; BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007).

Tecidos, culturas celulares e fluídos corporais, como plasma ou líquido cefalorraquidiano (LCR) são usados como fonte de proteínas. Além disso, podem ser estudadas, também, proteínas de bactérias, vírus e outros agentes infecciosos (BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007).

Cada tecido possui sua particularidade e alguns agentes acometem órgãos-alvo, os quais devem ser escolhidos para a realização de um correto diagnóstico. Além disso, a pureza e estabilidade da proteína, a prevenção da degradação e modificações durante a preparação das amostras tem importância crítica para o bom resultado do procedimento. Por esse motivo alguns aspectos devem ser considerados no momento da obtenção de amostras, conservação e preparação do material (FREEMAN & HEMBY, 2004; BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007).

A remoção rápida do tecido, a dissecação e o congelamento (em nitrogênio líquido ou a -80°C) são imperativos para manutenção do bom estado das proteínas

a serem estudadas no tecido selecionado (BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007). Tecidos frescos ou provenientes de biopsia devem estar livres de sangue, soro, estroma indesejável e gordura (AHMED & RICE, 2005). A prevenção da degradação e desfosforilação protéica durante a preparação podem ser conseguidas com a adição de proteases e inibidores de fosfatases (FREEMAN & HEMBY, 2004).

Após a coleta e armazenamento adequado da amostra, esta deve ser homogeneizada, até que nenhuma partícula de tecido seja visualizada. O lisado deve ser centrifugado, a fim de permitir a remoção de ácidos nucléicos, substâncias insolúveis e proteínas abundantes. Em muitos casos, é recomendado o fracionamento protéico com a intenção de concentrar proteínas menos abundantes e de interesse para análises futuras (BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007).

Métodos para promover a ruptura celular e homogeneização

A homogeneização é um dos passos para a preparação de qualquer amostra para análise de proteínas. O termo homogeneização tem vários sinônimos tais como mistura, emulsificação e dispersão, que em geral, significam a obtenção de amostras com mesma composição e estrutura em seu volume. Este processo deve alterar as propriedades físicas sem provocar qualquer mudança na composição química da amostra (BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007).

As forças aplicadas no processo de homogeneização permitem a fragmentação de proteínas em pequenas partículas, facilitando o processo de solubilização (CABRAL *et al.*, 1997). Os métodos de homogeneização usados podem ser divididos em cinco categorias: por homogeneização mecânica, ultrassônica, por pressão, por descongelamento e osmótica ou lise por detergentes (BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007).

Solubilização de proteínas

O processo de solubilização de proteínas afeta sobremaneira a qualidade do resultado final e é um determinante para o sucesso do processamento. A ruptura das interações que agregam proteínas, como por exemplo, ligações dissulfido/hidrogênio, forças de Van der Waals, ligações iônicas e interações hidrofóbicas, permite a separação de proteínas na solução (BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007).

Considerando a heterogeneidade de proteínas e presença de contaminantes em extratos biológicos, a separação simultânea dessas proteínas remanescentes é um grande desafio. Na tentativa de impedir modificações, agregações ou precipitações protéicas resultando em artefatos e subsequente perda de proteínas, o processo de solubilização de amostras implica no uso de caotrópicos (como uréia e/ou tiouréia), detergentes (como o 3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano sulfonado (CHAPS) ou Triton X-100), agentes redutores (como ditioneitol/ditioeritritol (DTT/DTE) ou tributilfosfina (TBP) e inibidores de proteases. O uso destas substâncias associado a um método de ruptura celular adequado e técnicas de dissolução e concentração de proteínas determina a efetividade da solubilização (BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007).

Remoção de contaminantes

Durante a preparação do tecido para análise de proteínas, é importante diminuir a heterogeneidade da amostra o máximo possível. No SNC, por exemplo, é particularmente abundante a presença de lipídios e esses devem ser eliminados juntamente com os ácidos nucleicos, para obtenção de resultados de alta qualidade. O método mais comumente usado é a precipitação seletiva de proteínas com acetona ou ácido tricloroacético (TCA) (FREEMAN & HEMBY, 2004).

O pH e a força iônica das amostras influenciam consideravelmente na solubilidade de proteínas. Por esse motivo, soluções tampões, soluções salinas e detergentes são incluídos em amostras. Normalmente, estas soluções tendem a interferir nos passos posteriores à separação de proteínas, inibindo o processo de digestão e, por conseguinte, complicando a análise, razão pela qual precisam ser removidos da análise em tempo apropriado (BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007).

Em muitos casos, o uso de proteína pura não pode ser feito porque proteínas como IgGs ou albumina constituem a grande maioria do concentrado de proteínas na célula. A eliminação seletiva dessas proteínas permite a melhor detecção de proteínas menos abundantes (LOLLO *et al.*, 1999).

Métodos de enriquecimento de proteínas

Amostras biológicas usadas como fonte para análise de proteínas são usualmente muito heterogêneas. Por isso, é de prioridade para a análise reduzir ao máximo a complexidade das amostras por meio de um pré-fracionamento ou promoção do enriquecimento das proteínas de interesse (BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007).

A idéia fundamental do pré-fracionamento é isolar amostras em frações distinguíveis contendo número restrito de moléculas. As amostras podem ser fracionadas usando uma variedade de métodos incluindo a precipitação, centrifugação, cromatografia líquida e métodos baseados em eletroforese, filtração e sedimentação por velocidade e equilíbrio. A seleção da técnica depende grandemente da natureza da amostra a ser analisada e do objetivo do estudo (FREEMAN & HEMBY, 2004).

Os métodos de enriquecimento permitem o aumento da concentração das proteínas de interesse. Esta etapa possui grande importância no estudo de proteínas, porque normalmente proteínas pouco abundantes possuem valiosas informações diagnósticas e são responsáveis por processos importantes na célula (AHMED & RICE, 2005).

ELETROFORESE EM GEL

A eletroforese é um processo analítico de separação de proteínas e outras moléculas, em que a migração de partículas acontece em um campo elétrico (matriz). Para tal evento é necessário que essas partículas sejam dotadas de carga elétrica (VESTERBERG, 1989). O fracionamento de proteínas por eletroforese começou no início do século 20 com a técnica de eletroforese livre em solução tampão, criada por Arne Tiselius em 1937, a qual foi substituída pelo uso de géis de poliacrilamida e agarose (PAGANO, 1999).

A escolha do material da matriz depende da resistência necessária para a separação efetiva dos fragmentos protéicos. O gel de agarose possui poros com

diâmetro que permitem a separação de fragmentos que variam de 200 pares de bases (pb) a 50 kilobases (kb). A poliácridamida é o material ideal para processos de sequenciamento, pois permite a separação de fragmentos muito pequenos, de até 1.000 pb (SILVA & SOUSA, 2002).

A eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) é um método simples e rápido que separa pequenas proteínas de tamanhos diferentes usando enzimas de restrição. Quando submetidas a um campo elétrico em pH neutro, as moléculas de proteína são atraídas para o pólo positivo e repelidas do pólo negativo. Quando a matriz apresenta resistência à migração das moléculas, os fragmentos menores podem se mover com maior facilidade do que os maiores, havendo, então, uma migração diferenciada dos fragmentos (Figura 1) (SILVA & SOUSA, 2002).

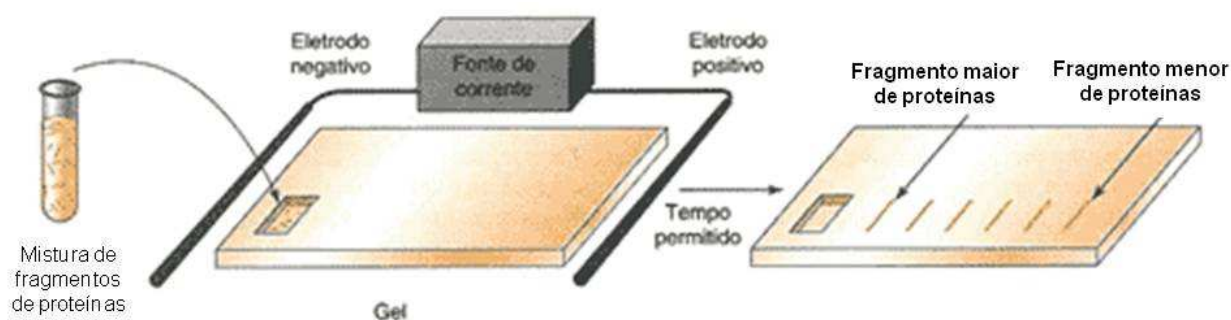


FIGURA 1: Esquema da eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE). A amostra é colocada em uma canaleta confeccionada no gel. Sob corrente elétrica, as proteínas migram do lado de carga negativa para o lado positivo. No gel, as proteínas se posicionam de acordo com seu tamanho e peso.

Fonte: http://www.nehmi-ip.com.br/imagens_servicos/bio_23_p.gif

A separação de proteínas por tamanho é obtida com o uso do gel de sódio dodecil sulfato-poliácridamida (SDS-PAGE) (VESTERBERG, 1993). Esta técnica é uma variação da técnica de PAGE amplamente utilizada para separar subunidades protéicas e determinar suas massas moleculares (PAGANO, 1999). A eletroforese SDS-PAGE é um poderoso procedimento, pois pode ser usado para separar todos os tipos de proteínas incluindo proteínas de membrana, do citoesqueleto e agregados de proteínas que normalmente são insolúveis em água, além de ser utilizado para separar proteínas em pequena quantidade (BÁRÁNY *et al.*, 1998).

Nesta fase, cada componente de uma mistura de proteínas é determinado pelo SDS-PAGE como bandas separadas, através da migração de proteínas. A mobilidade das proteínas no gel de poliácridamida é dependente do seu tamanho e da concentração de acrilamida. O gel age como uma peneira molecular. Pequenas proteínas movem através do gel mais rápido que proteínas maiores. Quanto mais alta a concentração de acrilamina, menores são os poros do gel e as proteínas se movem mais lentamente. Entretanto, géis com alta concentração de acrilamida são usados para determinar proteínas de tamanho pequeno, e géis com baixas concentrações de acrilamida são usados na determinação de proteínas grandes (PAGANO, 1999).

Antes da eletroforese, as amostras podem ser tratadas com uma solução de β -mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio (SDS). O β -mercaptoetanol é um agente de redução que cliva as ligações dissulfeto. O SDS é um detergente aniônico que desnatura proteínas e forma uma camada de cargas negativas, o qual as proteínas passam a ter uma carga intrínseca. Assim, as proteínas tratadas assumem uma forma de haste e carregadas por uma malha de carga negativa. Quando as proteínas tratadas são colocadas em eletroforese no SDS-PAGE, as proteínas migram para o eletrodo positivo. Desta forma, as proteínas podem ser separadas pelos seus pesos moleculares (PAGANO, 1999; GARCIA-RODRIGUEZ *et al.*, 2003; BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007).

TRANSFERÊNCIA PARA MEMBRANA

A fim de tornar as proteínas acessíveis à detecção por anticorpos realiza-se a transferência destas de um gel para uma membrana adsorvente (PAGANO, 1999). A membrana de transferência é colocada face-a-face com o gel de separação, e aplica-se uma corrente elétrica. Durante a transferência, o gel está na face do eletrodo negativo e a membrana em sua face positiva. Então, as proteínas contendo carga elétrica se movem do gel para a membrana mantendo a mesma disposição do gel. Como resultado desse processo de transferência e ligação à membrana, as proteínas são expostas a uma fina camada para detecção. A ligação das proteínas à membrana é baseada tanto em interações hidrofóbicas quanto em interações de cargas entre a membrana e as proteínas (KURIEN & SCOFIELD, 2003). A comunidade científica tem confrontado uma variedade de caminhos e significados para executar essa transferência (SILVA & SOUSA, 2002).

A eficiência na transferência de proteínas do gel para uma membrana sólida depende grandemente da natureza do gel, massa molecular das proteínas que estão sendo transferidas e o tipo de membrana usada. Proteínas com alto peso molecular marcam pobremente após SDS-PAGE, resultando em menores níveis de detecção no WB. No entanto, a eficiência na transferência de cada proteína tem sido facilitada com o aquecimento, tampões especiais e digestão proteolítica parcial antes da transferência (KURIEN & SCOFIELD, 2006).

Vários tipos de membrana estão disponíveis para a realização do processo. Membranas à base de nitrocelulose, polivinildina difluorada (PVDF), papel ativado ou nylon ativado têm sido utilizadas com sucesso para promover a ligação proteína/membrana no momento da transferência. A membrana mais comumente usada é a de nitrocelulose, por apresentar melhor eficiência na ligação de diferentes tipos de proteínas. Embora esta membrana apresente custo inferior que a de PVDF, é menos eficiente para proteínas que promovam ligações não-covalentes, somando-se a isto o fato de apresentarem uma fragilidade ao manuseio antes da hidratação (PAGANO, 1999; KURIEN & SCOFIELD, 2006).

Embora a transferência de proteínas do SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose ou de PVDF possa ser executada de diferentes maneiras tais como: difusão simples; transferência a vácuo; *electroblotting*, esta última é a que correntemente tem sido utilizada na atualidade. As principais vantagens do *Electroblotting* são a velocidade e a transferência completa quando comparada à difusão simples e à transferência a vácuo. O *eletroblotting* pode ser realizado por imersão completa de um sanduíche gel-membrana em uma solução tampão

(transferência úmida) ou colocando o sanduíche gel-membrana entre papel filtro absorvente em um tampão de transferência (transferência semi-seca). O método mais consagrado é o de transferência horizontal semi-seca (Figura 2) (PAGANO, 1999; KURIEN & SCOFIELD, 2006).

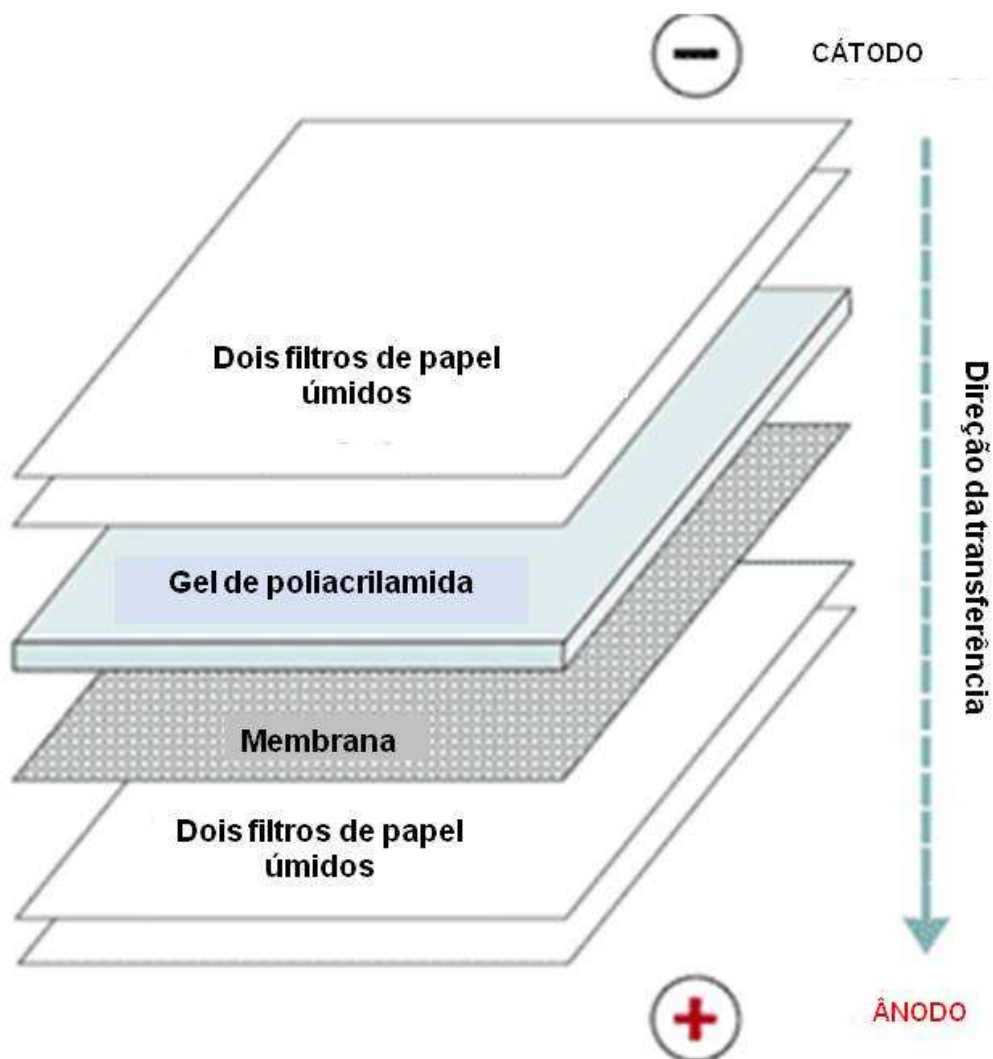


FIGURA 2: Transferência de proteínas de gel para membrana com o método de transferência horizontal semi seca.
Fonte: http://www.fermentas.com/techinfo/Electrophoresis/prot_eintransfer.htm

BLOQUEIO DE LIGAÇÕES INESPECÍFICAS

Uma grande quantidade de proteínas indesejáveis ligam-se fortemente à nitrocelulose em diferentes condições experimentais. No entanto, leite seco desnatado, soro albumina bovina (BSA), Triton X-100, Nonidet P-40 e Tween 20 são eficazes na remoção de ligações proteicas. Leite seco desnatado e BSA são rotineiramente utilizados em procedimentos de imunodeteção de proteínas para

evitar ligações inespecíficas (KURIEN & SCOFIELD, 2003; KURIEN & SCOFIELD, 2006).

ADIÇÃO DO ANTICORPO

Em mamíferos, um complexo grupo do sistema celular está envolvido na proteção do organismo contra substâncias tóxicas e invasão por agentes infecciosos. Como parte da resposta de defesa, células do sistema linfático podem ser induzidas para produzir proteínas específicas (anticorpos) que se ligarão às substâncias estranhas (antígenos) neutralizando seu impacto biológico. Em resposta a mudança imunológica há sintetização de um simples anticorpo que reconhece, e possui uma alta afinidade, uma região discreta chamada epítopo ou determinante antigênico, imunizando o antígeno. Devido um antígeno geralmente possuir vários epítopos diferentes, normalmente cada uma das várias células do sistema imune produzem um diferente anticorpo contra um dos vários epítopos do antígeno. De tal modo que um grupo de anticorpos, dos quais todos reagem com os diferentes antígenos, são designados como anticorpo policlonal. Mais tarde os anticorpos passaram a ser utilizados como diagnóstico de agentes para determinar a presença de proteínas em amostras biológicas (GLICK & PASTERNAK, 1998).

Normalmente, esses anticorpos (monoclonais ou policlonais) são utilizados para detectar uma proteína (antígeno ou epítopo) específica, ligando-se diretamente a ela, sendo o anticorpo primário da técnica de *immunoblotting*. Anticorpos monoclonais são melhores imunodetectores, entretanto, anticorpos secundários anti-peptídicos específicos devem ser usados (PAGANO, 1999).

Posteriormente, esta reação antígeno/ anticorpo primário será exposta a um anticorpo secundário direcionado à porções espécie-específicas do anticorpo primário (PAGANO, 1999). Normalmente, o anticorpo secundário está ligado à uma enzima reveladora, por exemplo biotina, que gera uma mudança de coloração ou um sinal fotométrico (Figura 3) (KURIEN & SCOFIELD, 2003).

Western Blotting

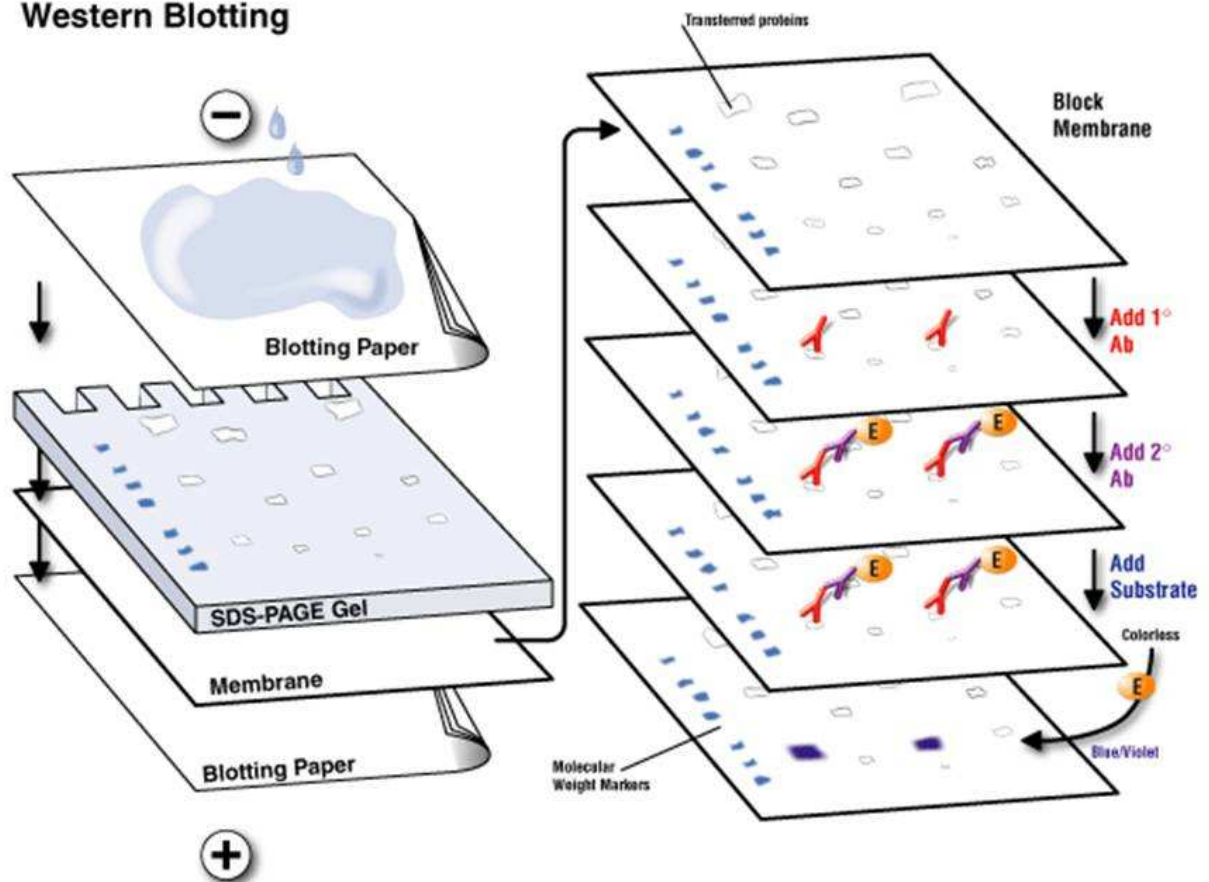


FIGURA 3: Técnica de Western blotting evidenciando a adição de anticorpos.
Fonte: <http://www.chemicon.com/resource/ANT101/a2B.asp>

DETECÇÃO DE ANTÍGENOS

A imunomarcagem de proteínas é mais sensível que os métodos de detecção convencionais (PAGANO, 1999). O *protein blotting* somente é eficiente quando um método de detecção apropriado é aplicado (KURIEN & SCOFIELD, 2003).

As proteínas no *immublotting* têm sido detectadas diretamente por uso de corantes orgânicos (*Ponceaus red*, amido negro, *fast green*), marcadores fluorescentes (fluorescamina, *Coumarin*), vários métodos com coloração de prata e partículas coloidais como ouro, prata, cobre, ferro ou *Indian ink*. O tipo de coloração a ser utilizado deve ser compatível com a membrana usada para a transferência de proteínas (PAGANO, 1999; KURIEN & SCOLFIED, 2003).

Após a adição do anticorpo primário e anticorpo secundário, de acordo com KURIEN & SCOLFIED (2006) dois métodos de detecção de antígenos são comumente usados: radioativo e imunoenzimática.

O método radioativo promove a ionização e subsequente autoradiografia para visualização da interação antígeno-anticorpo. A importância deste método de detecção está em franco desuso, por apresentar um alto custo e riscos à saúde (KURIEN & SCOLFIED, 2006).

A quimioluminescência preconiza a incubação de um substrato fluorescente que ao ser exposto a uma enzima reveladora associada ao anticorpo secundário gera uma coloração. Esta fluorescência é detectada por um

filme fotográfico ou câmeras especiais que capturam uma imagem digitalizada do WB. A imagem é analisada por densitometria, a qual avalia a quantidade de proteína colorida e quantifica os resultados em termos de intensidade óptica (KURIEN & SCOLFIED, 2006).

Atualmente, a quimioluminescência é o método imunoenzimático de eleição em WB. Normalmente, *horseadish* peroxidase ou fosfatase alcalina ligados à anticorpos são usados com inúmeros substratos solúveis que produzem produtos coloridos insolúveis. Esses métodos são de simples execução e não requerem equipamentos sofisticados, além de conferirem resultados rápidos. As desvantagens do método compreendem na dificuldade de obtenção de fotografias com qualidade, diferentemente do método radioativo, pois a coloração da reação apresenta baixo contraste, somando-se a isto, o fato de não produzir resultados quantitativos (PAGANO, 1999; KURIEN & SCOLFIED, 2006).

APLICAÇÕES DO WB NO DIAGNÓSTICO DAS ENFERMIDADES ANIMAIS

O emprego da técnica de WB teve início nos anos 70 com o advento da transferência de proteínas de uma matriz gelatinosa para uma membrana adsorvente. A partir disso, o emprego de anticorpos marcados com enzimas foi possível, o que permitiu a detecção e quantificação de proteínas previamente separadas (KURIEN & SCOFIELD, 2003). O WB é uma técnica recente, que possui alta sensibilidade e especificidade e seu emprego em diagnóstico das doenças dos animais é crescente (TALMI-FRANK *et al.*, 2006).

Algumas enfermidades infecciosas de animais podem ser diagnosticadas por *western blotting*. Um exemplo é o diagnóstico de encefalopatias espongiiformes transmissíveis (EETs), desordens neurodegenerativas crônicas fatais provocadas por príons, que podem acometer animais e seres humanos (NEVES, 2003; THOMZIG *et al.*, 2007). O diagnóstico confirmatório é dado pós-morte, por meio de exames histológicos e detecção da isoforma priônica, por meio de microscopia eletrônica, imuno-histoquímica e WB (COOLEY *et al.*, 2001; BARROS *et al.*, 2006). Entre os métodos imunológicos utilizados para detecção do *prion*, a técnica de WB tem sido amplamente utilizada por permitir o diagnóstico rápido e preciso, pois possui alta sensibilidade e especificidade, além de possibilitar novos estudos sobre patogênese e etiologia da enfermidade. Além disso, o WB associado ao anticorpo monoclonal 6H4 é o método de escolha para exames de sistema nervoso de bovinos com BSE em vários países da Europa. Desde janeiro de 2000, esta técnica vem sendo utilizada conjuntamente com o exame histopatológico e imuno-histoquímica para diagnóstico de BSE e *Scrapie* (COOLEY *et al.*, 2001; MIGLIORE *et al.*, 2012).

Outra doença importante na medicina veterinária é a leishmaniose visceral americana (LVA), causada pela *Leishmania chagasi*. Esta enfermidade é de grande importância em saúde pública por sua natureza zoonótica, sendo o cão reconhecido como um importante reservatório. O vetor da leishmaniose visceral no Brasil é a fêmea do inseto *Lutzomyia longipalpis* (STRAUSS-AYALI & BANETH, 2000; LINHARES *et al.*, 2005). Uma medida de controle da leishmaniose canina é a eliminação de cães soropositivos em técnicas sorológicas, como imunofluorescência indireta (IFA) e ELISA (SILVA *et al.*, 2005). No entanto, este método tem apresentado resultados conflitantes, principalmente, de falsos-positivos (DE PAULA *et al.*, 2003). Desta forma, estudos demonstraram que a técnica de WB mostrou-se mais sensível e precoce quando comparada às técnicas de IFA e ELISA, sugerindo a possibilidade de sua utilização como preditora da infecção no cão (AISA *et al.*,

1998; SILVA *et al.*, 2005). SILVA *et al.*, (2005) em estudo para reconhecimento antigênico de LVA em 120 cães demonstrou que 26% dos cães que eram negativos para o teste de IFA tiveram o reconhecimento de frações antigênicas de *L. chagasi* no WB. Os autores sugerem que os cães positivos para o WB e negativos para o IFA eram animais resistentes que apresentavam baixos níveis de anticorpos, dessa maneira não detectáveis pelo IFA.

A mieloencefalite equina por protozoário (MEP) é uma doença neurológica infecciosa de equinos e outros equídeos das Américas, frequentemente fatal, que tem como agente etiológico primário o protozoário *Sarcocystis neurona* (ROSSANO *et al.*, 2003; BARROS, 2007). Recentemente, outro microrganismo, *Neospora caninum/ Neospora hughesi*, foi implicado na etiologia de alguns casos de MEP (BARROS, 2007). Esta enfermidade tem sido diagnosticada no Brasil, porém não existem dados sobre a prevalência de casos. Ainda hoje, a quantidade de equídeos com sintomatologia nervosa que são necropsiados com diagnóstico de MEP é diminuta, portanto a prevalência pode ser maior do que imaginada anteriormente (BARROS, 2007).

O diagnóstico de MEP é dado por meio da realização de exame clínico neurológico e pela realização de WB para detecção de anticorpos de *S. neurona* em amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR) (ROSSANO *et al.*, 2003). Estudos de soroprevalência têm mostrado que anticorpos contra *S. neurona* estão presentes em grande proporção no soro de equinos aparentemente normais, por isso é recomendado a clínicos veterinários a obtenção de LCR para determinação de anticorpos contra o agente, indicando sua presença no SNC (FURR *et al.*, 2002).

A salmonelose é uma infecção grave e de grande importância na medicina e na veterinária. A *Salmonella enteritidis* possui proteínas de membrana e lipolissacarídeos que tem importante papel na virulência e nas propriedades imunológicas do agente, o que pode gerar quadros de intoxicação alimentar de diferentes intensidades. Estudos utilizando WB são realizados para caracterização dessas proteínas de membrana, principalmente para possibilitar o desenvolvimento de vacinas, que são importante método para evitar a doença (MARIPANDI & AI-SALAMAH, 2010).

Em suínos, a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* é responsável por grandes perdas econômicas na suinocultura, por apresentar alta morbidade e baixa mortalidade. O diagnóstico precoce e confirmatório tem grande relevância para eliminação do agente em uma granja acometida. Assim, o WB tem sido usado para diminuir resultados os erros e resultados discrepantes dos testes sorológicos (AMERI *et al.*, 2006).

Na pesquisa, a técnica é muito empregada para entendimento de mecanismos de neoplasias (ZHANG *et al.*, 2012; CATTELANI *et al.*, 2012), no estudo de doenças hereditárias (SETA *et al.*, 1996), para descoberta de proteínas para produção de vacinas (MARIPANDI & AI-SALAMAH, 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de eletroforese permite a separação de proteínas de cargas elétricas diferentes, mas é limitada por não produzir a quantificação e detecção de proteínas específicas. As técnicas de *blotting* abriram portas para novos estudos acerca da patogênese e etiologia de inúmeras enfermidades animais, garantindo o avanço da ciência. O *Western blotting* permitiu que proteínas específicas fossem detectadas, se firmando como um método de diagnóstico de eleição de inúmeras

doenças, por ser altamente sensível e específico e de rápido resultado.

O uso do WB na rotina diagnóstica ainda é insipiente, por se tratar de uma técnica que necessita mão-de-obra qualificada e por apresentar custo relativamente superior quando comparado a métodos convencionais e métodos alicerçados em base da biologia molecular. Porém, vários estudos demonstram que a utilização de técnicas convencionais já consagradas, em determinadas doenças, não apresentam resultados totalmente confiáveis e satisfatórios, sendo a técnica de *immunoblotting* preferencial para confirmação diagnóstica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, N.; RICE, G.E. Strategies for revealing lower abundance proteins in two-dimensional protein maps. **Journal of Chromatography B**. Amsterdam. v.815, p.39–50, 2005.

AISA, M.J.; CASTILLEJO, S.; GALLEGO, M.; FISA, R.; RIERA, M.C.; DE COLMENARES, M.; TORRAS, S.; ROURA, X.; SENTIS, J.; PORTUS, M. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. Illinois. v.58, p.154-159, 1998.

AMERI, M.; ZHOU, E. M.; HSU, H. W. Western blot immunoassay as a confirmatory test for the presence of anti-Mycoplasma hyopneumoniae antibodies in swine serum. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 18, p. 198–201, 2006.

BÁRÁNY, M.; BÁRÁNY, K.; GIOMETTI, C.S. Gel electrophoresis for studying biological function. **Analytica Chimica Acta**. Amsterdam. v.372, n.1-2, p.33-66, 1998.
BARROS, C.S.L. Mieloencefalite equina por protozoário. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3ed., Palloti:Santa Maria, v.1, p.673-678, 2007.

BARROS, C.S.L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I.S.; LEMOS, R.A.A. Encefalopatia espongiiforme bovina (BSE). **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. Academia Vallée de Educação Corporativa: São Paulo. 1ed, p. 47-53. 2006. 207p.

BODZON-KULAKOWSKA, A.; BIERCZYNSKA-KRZYSIK, A.; DYLAG, T.; DRABIK, A.; SUDER, P.; NOGA, M.; JARZEBINSKA, J.; SILBERRING, J. Methods for samples preparation in proteomic research. **Journal of Chromatography**. Amsterdam. v.849 , p.1-31, 2007.

CABRAL, L.C.; WANG, S.H.; ARAUJO, F.B.; MAIA, L.H. Efeito da pressão de homogeneização nas propriedades funcionais do leite de soja em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. v.17, n.3, 1997.

CATTELANI, S.; FERRARI-AMOROTTI, G.; GALAVOTTI, S.; DEFFERRARI, R.; TANNO, B.; CIALFI, S.; VERGALLI, J.; FRAGLIASSO, V.; GUERZONI, C.; MANZOTTI, G.; SOLIERA, A. R.; MENIN, C.; BERTORELLE, R.; MCDOWELL, H.P.; INSERRA, A.; BELLI, M. L.; VARESIO, L.; TWEDDLE, D.; TONINI, G. P.; ALTAVISTA, P.; DOMINICI, C.; RASCHELLÀ, G.; CALABRETTA, B. The p53

codon 72 Pro/Pro genotype identifies poor-prognosis neuroblastoma patients: Correlation with reduced apoptosis and enhanced senescence by the p53-72P isoform. **Neoplasia**. v.14, n. 7, p. 634-643, 2012.

COOLEY W.A., CLARK J.K., RYDER S.J., DAVIS L.A., FARRELLY S.S.J.; STACK M.J. Evaluation of a Rapid Western Immunoblotting Procedure for the Diagnosis of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in the UK. **Journal of Comparative Pathology**. Edinburgh. v.125, n.1, p.64-70, 2001.

DE PAULA, A.A.; DA SILVA, A.V.M.; FERNANDES, O.; JANSEN, A.M. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. **Journal of Parasitology**. Lawrence. v.89, s.4, p.832-836, 2003.

FREEMAN, W.M.; HEMBY, S.E. Proteomics for Protein Expression Profiling in Neuroscience. **Neurochemical Research**. New York. v.29, n.6, p.1065-1081, 2004.

FURR, M.; MACKAY, R.; GRANSTROM, D.; SCHOTT, H.; ANDREWS, F. Clinical diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Journal of Veterinary Internal Medicine**. Lawrence. v.16, n.5, p.618-621, 2002.

GARCIA-RODRIGUEZ, S.; CASTILLA, S.A.; MACHADO, A.; AYALA, A. Comparison of methods for sample preparation of individual rat cerebrospinal fluid samples prior to two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Biotechnology Letters**. Dordrecht. v.25, p.1899–1903, 2003.

GLICK, B. R.; PASTERNAK, J. J. **Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA**. 2.ed. Washington: ASM Press, 1998. 683p.
KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Protein blotting: a review. **Journal of Immunological Methods**. Amsterdam. v.274, p.1-15, 2003.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Western blotting. **Methods**. San Diego. v.38, p.283-293, 2006.

LINHARES, G.F.C.; CHAVES, N.S.T.; DUARTE, S.C.; FERNANDES, P.R.; AMARAL, A.V.C.; SOUZA, M.A. Relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**. Goiânia. v.34, n.1, p.69-72, 2005.

LOLLO, B.A.; HARVEY, S.; LIAO, J.; STEVENS, A.C.; WAGENKNECHT, R.; SAYEN, R.; WHALEY, J.; SAJJADI, F.G. Improved two-dimensional gel electrophoresis representation of serum proteins by using ProtoClear. **Electrophoresis**. Weinheim. v.20, p.854–859, 1999.

MARIPANDI, A.; AL-SALAMAH, A. A. Analysis of *Salmonella enteritidis* outer membrane proteins and lipopolysaccharide profiles with the detection of immune dominant proteins. **American Journal of Immunology**. v. 6, n. 1, p. 1-6, 2010.

MIGLIORE, S.; ESPOSITO, E.; PIRISINU, L.; MARCON, S.; DI BARI, M.; D'AGOSTINO, C.; CHIAPPINI, B.; CONTE, M.; SEZZI, E.; DE GROSSI, L.; AGRIMI, U.; VACCARI, G.; NONNO, R. Effect of PrP genotype and
ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 1717 2012

route of inoculation on the ability of discriminatory Western blot to distinguish scrapie from sheep bovine spongiform encephalopathy. **Journal of General Virology**. v. 93, n. 2, p. 450-455, 2012.

NEVES, A.C. O paradigma do prion. **Revista Neurociências**. São Paulo. v.11, n.1, p.40-45, 2003.

PAGANO, M. Application of electrophoresis and related methods, such as western blotting and zymography to the study of some proteins and enzymes. **Analytica Chimica Acta**. Amsterdan. v.383, p.119-125, 1999.

ROSSANO, M.G.; KANEENE, J.B.; SCHOTT, H.C.;SHELIN, K.D.; MANSFIELD, L.S. Assessing the agreement of Western blot test results for paired serum and cerebrospinal fluid samples from horses tested for antibodies to *Sarcocystis neurona*. **Veterinary Parasitology**. Amsterdan. v.115, p.233–238, 2003.

SARIMEHMETOĞLU H.O. Application of *Western Blotting* for the immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* in cattle using excretory/secretory antigens. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, Ankara. v.26, p.1061-1065, 2002.

SETA, N.; Barnier, A.; Hochedez, F.; Besnard, M. A.; Durand, G. Diagnostic value of Western blotting in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. **Clinica Chimica Acta**. v. 254, p. 131-140, 1996.

SILVA, F.B.; SOUSA, S.M.G. Aplicações da biologia molecular na odontologia: conceitos e técnicas. **FOL • Faculdade de Odontologia de Lins / UNIMEP**. Lins. v.14, n.2, p.7-14, 2002.

SILVA, A.V.M.; DE PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A.; CARREIRA, J.C.A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.21, n.1, p.324-328, 2005.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine Visceral Leishmaniasis. In: Carmichael, L. Recent advances in canine infectious diseases. **International Veterinary Information**, Ithaca, s.n, p.1-10, 2000.

TALMI-FRANK, D.; STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C.L.; BANETH G. Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative *Western Blot* analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**. Oxford. v.13, n.2, p. 271–276, 2006.

THOMZIG, A.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.; WREDE, A.; WEMHEUER, W.; BRENIG, B.; KRATZEL, C.; LEMMER, K.; BEEKES, M. Accumulation of pathological prion protein PrP^{Sc} in the skin of animals with experimental and natural scrapie. **Public Library of Science Pathogens**. San Diego. v.3, n.5, p.659-667, 2007.

VESTERBERG, O. History of electrophoretic methods. **Journal of Chromatography**. Amsterdam. v.20, n.480, p.3-19, 1989.

VESTERBERG, O. A short history of electrophoretic methods. **Electrophoresis**.

Weinheim. v.14, n.12, p.1243-1249, 1993.

ZHANG, Y.; LI, Q.; HUANG, W.; ZHANG, J.; HAN, Z.; WEI, H.; CUI, J.; WANG, Y.; YAN, W. Increased expression of apoptosis-related protein 3 is highly associated with tumorigenesis and progression of cervical squamous cell carcinoma. **Human Pathology**. Article in press, 2012.