



ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**ESTUDO DA SENSIBILIZAÇÃO A PROTEÍNAS DO
PHLEUM E *OLEA* EM DOENTES COM DOENÇA
ALÉRGICA RESPIRATÓRIA SAZONAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**José Eduardo Caldeira Moreira
5702**

Orientador (es):

Professora Dra. Célia Antunes

Professor Dr. Rui Brandão

Évora, 2011



ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**ESTUDO DA SENSIBILIZAÇÃO A PROTEÍNAS DO
PHLEUM E *OLEA* EM DOENTES COM DOENÇA
ALÉRGICA RESPIRATÓRIA SAZONAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**José Eduardo Caldeira Moreira
5702**

Orientador (es):

Professora Dra. Célia Antunes

Professor Dr. Rui Brandão

Évora, 2011

AGRADECIMENTOS

Chegou o momento de expressar os meus agradecimentos a todas as pessoas que me apoiaram e que acreditaram em mim e por isso merecem o meu reconhecimento.

Agradeço aos meus orientadores Professora Doutora Célia Antunes e ao Professor Doutor Rui Brandão pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência, dedicação e profissionalismo. Acima de tudo, obrigado por me continuarem a acompanhar nesta jornada e por estimularem o meu interesse pelo conhecimento e pela vida académica, um Muito Obrigado.

À Doutora Luísa Lopes pela sua boa disposição, ajuda, entrega e dedicação, e pela oportunidade de realizar este estudo com dados em primeira-mão sobre a doença Alérgica Respiratória sazonal em doentes dos Hospitais de Évora e Elvas.

À Sofia Fernandes pela sua imprescindível ajuda e dedicação, mas essencialmente pelos bons momentos que passamos juntos, não poderia ter melhor companhia, a ela, um Muito Obrigado.

À Raquel Ferro um Grande Obrigado por toda a ajuda, paciência, dedicação, concelhos e amizade ao longo destes anos. É sem dúvida um pilar neste estudo.

À Filipa Lopes por toda amizade construída neste mestrado, por partilhar todos os momentos vividos no Laboratório e por me ter recebido em casa dela de braços abertos, um Muito Obrigado.

À Dona Jesuina por me ter ajudado no laboratório e pelos bons momentos que me proporcionou, bem como, a sua amizade.

À minha mãe por todo o apoio, carinho, amor, preocupação, entre outros valores que regem a minha vida, sem ela de certeza que não era possível a realização deste trabalho, Muito, Muito Obrigado

Aos meus avós, pelo amor, amizade e carinho quando estava a escrever em vez de atender às suas necessidades, um Muito Obrigado.

Ao meu pai por toda a confiança, apoio, amizade. Muito obrigado

À minha família que sempre me apoiou.

Aos meu amigos que tornaram directa ou indirectamente, possível a execução deste trabalho.

A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

INDÍCE

1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	1
1.1 Alergia e Atopia	1
1.2 Sistema Imunitário e a Resposta Alérgica	2
1.2.1 O Papel das imunoglobulinas	3
1.2.2 Fisiopatologia da Alergia	5
1.3 Polinose	6
1.4 Pólenes e Alergénios	7
1.4.1 Nomenclatura e Classificação	9
1.5 Factores ambientais que afectam as concentrações de pólen e de alergénios no ar	9
1.6 Caracterização do pólen e dos alergénios das <i>Gramíneas</i>	10
1.7 Caracterização do pólen e dos alergénios da <i>Olea europaea L.</i>	13
1.8 Relação entre pólenes, alergénio e reacção a testes cutâneos	16
1.9 Monitorização de Bioaerossóis	17
1.10 Métodos para Detecção e Quantificação de Antígenos	18
2. PROBLEMÁTICA	22
3. OBJECTIVOS CIENTÍFICOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Caracterização da população e determinação da sensibilização	25
4.1.1 Teste cutâneo de Prick	25
4.2 Monitorização do bioaerossol	26
4.2.1 Colector Volumétrico de tipo Hirst	27
4.2.2 Colector de Impacto para bioaerossóis	27
4.3 Recolha de alergénio em ar atmosférico e preparação das amostras	29
4.4 Preparação dos Filtros de poli-uretano para Utilização no CHEMVOL- Sample	30
4.5 Substituição dos Filtros de poli-uretano no CHEMVOL-Sampler	31
4.6 Extracção da Fracção Proteica e Preparação das amostras	32

4.7	Quantificação dos alergénios Phl p 5 \ Ole e 1 por ELISA	33
4.7.1	Ligação do anticorpo à fase sólida	33
4.7.2	Lavagem das placas	33
4.7.3	Saturação da placa com BSA	34
4.7.4	Ligação do antigénio	34
4.7.5	Adição do Anticorpo Secundário	35
4.7.6	Adição da enzima estreptavidina-peroxidase	35
4.7.7	Adição do Substrato e Paragem da Reacção	36
4.7.8	Captação e Quantificação dos aeroalergénios Phl p 5 \ Ole e 1 na cidade de Évora	36
4.7.9	Determinação da quantidade de alergénio por m ³ de ar	38
4.8	Caraterização da população em estudo e determinação da sua sensibilização	39
4.9	Recolha e análise de sintomatologia e sua correlação com os parâmetros ambientais medidos	40
4.9.1	Registo dos sintomas dos pacientes	40
4.9.2	Análise de correlação entre os sintomas dos pacientes e os doseamentos atmosféricos de pólen e aeroalergénios	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Conteúdo em pólen de <i>Poaceae</i> e <i>Olea</i> e alergénios Phl p 5 e Ole e 1 no ar exterior da cidade de Évora em 2011	42
5.2	Determinação da sensibilização da população em estudo	47
5.3.	Análise da prevalência dos sintomas e estudo da sua correlação com os conteúdos polínicos ou de aeroalergénios	49
6.	CONCLUSÃO	55
7.	CONSIDERAÇÕES PARA O FUTURO	56
8.	BIBLIOGRAFIA	57
9.	ANEXOS	68

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica da molécula de anticorpo, exibindo detalhadamente a região de ligação com o antigénio (Retirado de Cruz, 2008).	4
Figura 2. Esquema representativo dos dois tipos de receptores de IgE (FC ϵ RII e FC ϵ RI) (Retirado de http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2002/imuno02_alergias.htm)	5
Figura 3. Pólen de <i>Poaceae</i> (retirado de Caeiro, 2004).	11
Figura 4. Pólen de <i>Olea</i> (retirado de Caeiro, 2004).	14
Figura 5. Exemplos de formatos de ELISA. (Adaptado de Dias 2009).	19
Figura 6. Teste cutâneo de Prick (retirado de publica.opovo.com.br).	26
Figura 7. Colector de impacto do tipo Hirst (retirado de Ferro, 2010).	27
Figura 8. CHEMVOL-Sampler e os vários tamanhos de filtros (adaptado de http://www.bgiusa.com).	28
Figura 9. Colector de impacto Rupperecht and Patashnick ChemVol [®] 2400 high-volume cascade impactor (Albany, NY, USA) equipado com dois filtros.	30
Figura 10. Mudança dos filtros XL e M.	31
Figura 11. Obtenção do produto a reacção, após a adição de TMB e paragem da reacção (retirado de Ferro, 2010).	36
Figura 12. Aspecto de uma curva de Calibração sigmóide log-logística utilizando soluções padrão.	37
Figura 13. Idade média dos pacientes da população em estudo de acordo com o género (Masculino e Feminino). As barras representam o valor médio \pm 3 epm. ($p>0,05$).	39
Figura 14. Réplica do questionário que foi entregue aos pacientes.	41
Figura 15. Distribuição de alergénio nas fracções PM >10 μ m (XL) e 2,5 $>$ PM >10 μ m (M) durante a estação polínica de 2011. (A) Variação diária da concentração de Phl p 5 e percentagem de distribuição (“inlet”); (B) Variação diária da concentração de Olea e 1 e percentagem de distribuição (“inlet”).	43
Figura 16. Perfil da curva polínica de <i>Poaceae</i> e conteúdo do aeroalergénio Phl	

p 5 presente no ar atmosférico exterior nas estações polínicas de 2011.	44
Figura 17. Perfil da curva polínica de <i>Olea Europea</i> e conteúdo do aeroalergénio Ole e1 presente no ar atmosférico exterior na estação polínica de 2011.	45
Figura 18. Concentração de grãos de pólen e concentração de Phl p 5 (A) e Ole e 1 (B) ao longo da época de 2011.	45
Figura 19. Prevalência da sensibilização a proteínas de <i>Phleum</i> e <i>Olea</i> na população em estudo. (A). Total de Pacientes sensíveis quer á <i>Olea</i> total, Ole e 1, Ole e 2 quer ao <i>Phleum</i> total, Phl p 5, Phl p 1. (B) Pacientes que apresentam sensibilidade <i>Phleum</i> total, Phl p 5, Phl p 1. (C) Pacientes que apresentam sensibilidade <i>Olea</i> total, Ole e 1, Ole e 2.	48
Figura 20. Prevalência dos sintomas dos pacientes ao longo da época polinica (Abril até Junho de 2011).	50
Figura 21. Correlação dos sintomas com as concentrações polínicas (A) e de aeroalergénio de Phl p 5 (B).	51
Figura 22. Correlação dos sintomas com as concentrações polínicas (A.1) e de aeroalergénio de Ole e 1 (A.2).	52
Figura 23. Correlação dos sintomas com as concentrações polínicas (A1) e dos aeroalergénios de Phl p 5 + Ole e 1 (A2).	53
Figura 24. Correlação entre a intensidade relativa dos sintomas e as contagens polínicas (A) e os aeroalergénios (B). Correlação entre os sintomas e o somatório de Ole e1 e Phl p5 ($p < 0,05$). (B) Correlação entre os sintomas e o somatório das contagens polinicas. ($p > 0,05$).	54

INDÍCE DE QUADROS

Quadro 1. Relação de gramíneas que produzem pólenes alergénicos da família Poaceae, de acordo com seus respectivos alérgenos e massa molecular relativa (Mr) (adaptado Suphioglu 2000 com modificações).	12
Quadro 2. Proteínas presentes no grão de pólen de Oliveira (adaptado Ferro, 2010).	16

ABREVIATURAS

APCs – *antigen-presenting cells*

BSA – (Bovine serum albumin) Albumina de soro bovino

ELISA – (Enzyme linked immunosorbent assay) (ensaio imunoenzimático)

FcεRI – Receptor de IgE de alta afinidade

FcεRII – Receptor de IgE de baixa afinidade

IgA – Imunoglobulina de classe A

IgD – Imunoglobulina de classe D

IgE – Imunoglobulina de classe E

IgG – Imunoglobulina de classe G

IgM – Imunoglobulina de classe M

IFN – Interferão (citocina)

IL – interleucina

ITAMs – (Immunoreceptor Tyrosine-based activation motifs) Motivos de ativação de Imunoreceptores compostos por Tirosina

IUIS - *International Union of Immunological Societies- Allergen Nomenclature Subcommittee*

Mr – Massa molecular relativa

p – partículas

PBS – (Phosphate buffered saline) Solução salina tamponada com fosfatos

PBS-T – (PBS with tween 20) PBS adicionada de tween 20

POX – Estreptavidina-peroxidase (Streptavidin-peroxidase)

PRRs – *pattern-recognition receptors*

RAST – (Short for radioallergosorbent test)

SPAIC – Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica

TCP – teste cutâneo de prick

TCR – (*T cell receptor*) receptor da célula T

Th – (lymphocyte T) Linfócito T

Tween 20 – Monolaurato de Polioxietileno Sorbitano

TMB – Tetrametilbenzidina

VDJ – região variável das imunoglobulinas

RESUMO

José Eduardo Caldeira Moreira (2011). **Estudo da Sensibilização às Proteínas do *Phleum* e *Olea* em Doentes com Doença Alérgica Respiratória Sazonal**. Dissertação de Mestrado (C.M. Antunes e R. Brandão, orientadores) Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

As glicoproteínas Phl p 5 e Ole e 1 são alergologicamente muito relevantes no Alentejo. Este estudo teve como objectivo estudar a sensibilização a proteínas de *Phleum pratense* e *Olea europea* em doentes das consultas externas de Imunoalergologia dos Hospitais do distrito de Évora e correlacionar a intensidade da sua sintomatologia com os conteúdos em pólen e alergénios no ar.

Em 2011 os perfis de distribuição temporal dos aeroalergénios e de pólen sobrepuseram-se, indicando que o alergénio é maioritariamente transportado pelos grãos de pólen. Cerca de 50% dos pacientes revelaram-se sensibilizados a *Phleum* e 30% a *Olea*, tendo-se evidenciado um agravamento dos sintomas com o aumento da concentração de aeroalergénio no ar.

Os resultados sugerem que a quantificação dos aeroalergénios pode complementar a informação obtida com base no método das contagens polínicas e permitir melhor compreender a sintomatologia. Poderão ainda contribuir para o desenvolvimento de estratégias de prevenção da exposição a aeroalergénios.

ABSTRACT

José Eduardo Caldeira Moreira (2011). Study of the Sensitization to *Olea* and *Phleum* proteins in Patients with Seasonal Respiratory Allergic Disease. Master Dissertation (C.M. Antunes e R. Brandão, Supervisors). Science and Technology School, University of Évora, Évora, Portugal.

The glycoproteins of Phl p 5 of grasses and Ole e 1 of the Oleaceae family are allergologically relevant in Alentejo. The aim of this work was to study the sensitization of patients to the pollen proteins of *Phleum pratense* and *Olea europea* in patients of the External Consultations of Immunoalergology at the Hospital of Evora and to correlate their symptomatology with airborne pollen and allergen content in the air.

In 2009 pollen season, the allergen profile followed the pollen profile and a positive correlation between the air content of the two variables was found, suggesting that allergens are associated to the respective pollen grains.

Sentitization to allergens of Phleum and Olea were $\approx 50\%$ and $\approx 30\%$, respectively. The severity of simptomatology was enhanced by higher aeroallergen levels.

The results suggest that quantification of aeroallergens complement the method of pollen counting contributing to a better understanding of allergy symptoms and may contribute to the development of novel prevention strategies.

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1. Alergia e Atopia

A alergia é uma das doenças crónicas com maior prevalência na sociedade moderna (Ring et al., 2001). As manifestações clínicas desencadeadas pela exposição a um determinado estímulo, o qual é tolerável para a maioria das pessoas, variam entre indivíduos. A estas manifestações chamam-se reacções de hipersensibilidade tipo I ou alergia e caracterizam-se pela ocorrência de diversos mecanismos imunológicos. A tendência pessoal ou familiar, de ordem genética, que induz, a produção de anticorpos de classe IgE é denominada atopia (Johansson et al., 2004).

As manifestações clínicas da alergia ocorrem sob a forma de asma, rinite ou dermatite atópica, entre outras (Lemanske-Junior et al, 2003).

Reconhece-se a clara predisposição genética para o desenvolvimento de doenças alérgicas. Se, por exemplo, ambos os pais forem atópicos, o risco de a descendência vir a desenvolver alergia mediada por IgE é de 40 a 60%, mas em crianças em que nenhum dos pais é atópico, esse risco varia entre os 5 e 10% (Johansson et al., 2001). Uma das técnicas mais usuais para o reconhecimento do estado atópico é o teste Prick. Quando o extracto padronizado de alergénio é introduzido na pele, interage com as IgE ligadas aos mastócitos, causando libertação de histamina e consequente reacção de eritema e pápula. Estes testes permitem avaliar, de um modo simples, rápido e económico, a natureza alérgica do processo mediado por IgE (Rodrigues et al., 2009).

A rinite alérgica distingue-se pelos sintomas característicos de inflamação nasal, tais como: aumento de secreção, obstrução da cavidade, espirros e prurido. Pode também ser acompanhada de conjuntivite (Johansson et al., 2004). Estes sintomas podem ser, então, desencadeados na sequência da exposição a elementos extrínsecos capazes de causar doença alérgica, os alergénios, presentes no meio ambiente, como pólenes de plantas ou ácaros de pó domiciliar (Taketomi, et al. 2006).

1.2. Sistema Imunitário e a Resposta Alérgica

O sistema imunitário desempenha um papel de defesa do organismo contra ataques de agentes invasores agressivos, quer estes sejam de origem química, física ou biológica. O sistema de defesa é capaz de detectar uma grande variedade de agentes, nomeadamente fungos, bactérias e vírus, assim como outros microrganismos que, conseqüentemente, representam uma ameaça ao organismo ao penetrarem neste através do ar, da água dos alimentos, ou, ainda, através de lesões do tegumento. Há ainda agentes externos não patogénicos que podem desencadear alterações no sistema imunitário, provocando reacções alérgicas. O sistema imunitário é portanto um complexo que inclui vasos linfáticos, tecidos e órgãos linfóides, assim como uma diversidade de células efectoras, nomeadamente diferentes tipos de leucócitos, plasmócitos e macrófagos. A imunidade celular ou imunidade mediada por células apresenta como principais intervenientes os linfócitos T (Cruz, 2008).

Os linfócitos T reconhecem somente os antígenos que sejam corretamente apresentados, o que implica que estes se encontrem ligados a marcadores presentes na superfície de determinadas células imunitárias – células apresentadoras de antígenos. O reconhecimento dos antígenos, por parte das células T, é possível porque estas possuem, na sua superfície, um recetor específico para um determinado antígeno designado por TCR e que é comum a todas elas, sendo este, suficientemente variável para se adaptar aos diferentes antígenos e para permitir a formação de um repertório imunológico, de acordo com as realidades do meio exterior, onde se encontra inserido o organismo (Cruz, 2008).

Os aeroalergénios são antígenos indutores de doenças alérgicas, presentes no ambiente atmosférico. O ambiente dispõe de inúmeros alergénios, provenientes de diversas fontes, sendo maioritariamente de origem proteica ou glicoproteica (Johansson et al., 2004; Meyer et al., 2004).

Actualmente acredita-se que os alergénios podem ser proteínas que activam a resposta imunitária inata através da sua actividade enzimática intrínseca, pela activação de receptores com padrões de reconhecimento (PRRs) nas células da mucosa epitelial ou directamente nas células apresentadoras de antígenos (APCs) (Behrendt et

al., 2001; Rodríguez et al., 2007; Paul, 2008). O epitopo de um alergénio é pequeno, geralmente formado por 5 a 7 resíduos de aminoácidos que combinam com a região variável do anticorpo e 8 a 15 aminoácidos que se ligam a células T (Arlian, 2002).

O contacto inicial do alergénio com a mucosa leva à produção de IgE, sendo que a resposta pela IgE é um evento local, que ocorre no ponto de entrada do alergénio no organismo, isto é, em superfícies mucosas e/ou em linfonodos locais (Abbas et al., 2003).

1.2.1 Papel das Imunoglobulinas

As imunoglobulinas constituem um grupo de glicoproteínas do soro e fluidos tecidulares de todos os mamíferos. São bifuncionais, sendo que uma região da molécula é responsável pela ligação ao antigénio e a outra promove as chamadas funções efectoras, que incluem a fixação das imunoglobulinas ao tecido do hospedeiro e às várias células do sistema imunitário, incluindo as células fagocitárias e ao elemento C1q da via clássica do sistema complemento. A estrutura básica de todas as imunoglobulinas consiste numa unidade com duas cadeias polipeptídicas leves idênticas, e duas pesadas, unidas por pontes dissulfureto. As classes e subclasses de uma molécula de imunoglobulina são determinadas pelas suas cadeias pesadas e são conhecidas, até o momento, cinco classes em mamíferos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. (Roitt et al., 2006).

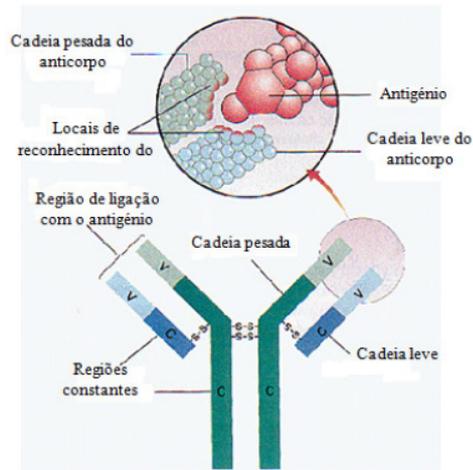


Figura 1. Estrutura básica da molécula de anticorpo, exibindo detalhadamente a região de ligação com o antígeno (Retirado de Cruz, 2008)

Destas imunoglobulinas, a IgE exerce um papel substancial na resposta alérgica. Indivíduos com alergia apresentam níveis de IgE total que podem estar ou não elevados, mas os níveis de IgE específicas a um ou mais alérgenos encontram-se efetivamente elevados (Corry et al, 1999). Antagonicamente, os níveis de IgE específicas estão reduzidos ou indetectáveis nos indivíduos não alérgicos (Gould et al., 2003).

A IgE é o isotipo de anticorpo que contém a cadeia pesada épsilon (ϵ). O domínio C ϵ 3 é responsável pela ligação da molécula aos seus receptores (Ishizaka, 1966). Circula como um anticorpo bivalente e está normalmente presente no plasma em concentração inferior a 1 μ g/mL. Em condições patológicas, tais como nas infecções helmínticas e na alergia, esse nível pode subir para mais de 1.000 μ g/mL (Abbas e tal., 2008). Embora a sua meia vida no soro seja de alguns dias, os mastócitos podem permanecer sensibilizados pela IgE por muitos meses, como resultado da ligação de alta afinidade aos receptores Fc ϵ RI, o que protege a IgE da destruição pelas proteases séricas (Gilfillan et al., 2006).

O outro receptor para IgE, Fc ϵ RII ou CD23, possui menor afinidade para a imunoglobulina e apresenta-se em duas formas, Fc ϵ RIIa e Fc ϵ RIIb, diferindo apenas na composição da região citoplasmática amino-terminal. Como os demais receptores

activados por imunoglobulinas, a porção intracitoplasmática dos recetores para IgE é constituída por domínios ITAMS (Gilfillan et al., 2006).

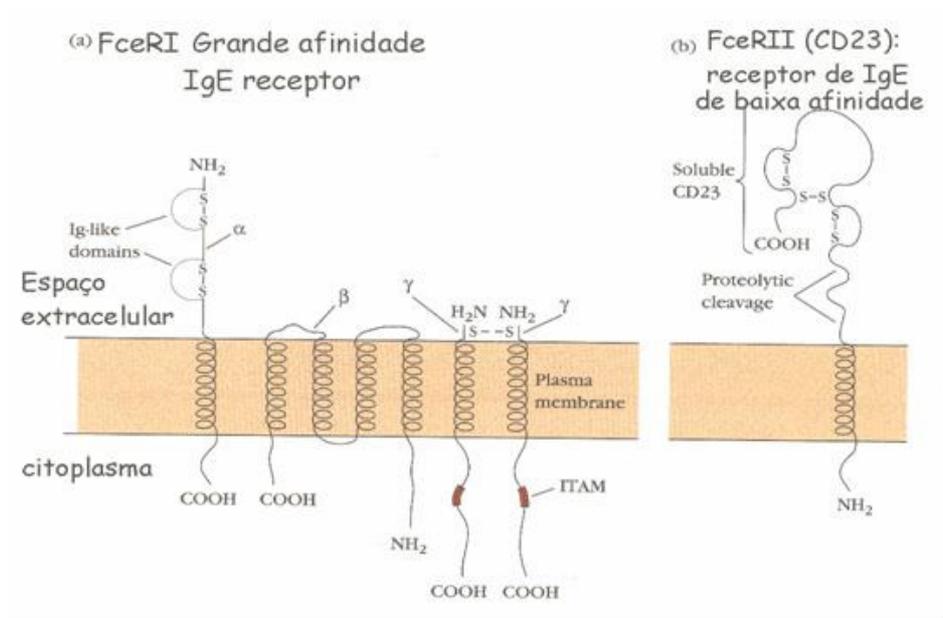


Figura 2. Esquema representativo dos dois tipos de receptores de IgE (FC_RII e FC_RI) (Retirado de http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2002/imuno02_alergias.htm).

1.2.2. Fisiopatologia da Alergia

A alergia é uma condição cuja origem é multifactorial, dependendo da interacção de vários factores genéticos e ambientais, sendo o nível de exposição a alergénios um dos factores ambientais fulcrais para o desenvolvimento da alergia (Lund et al, 2005).

A resposta inflamatória alérgica que ocorre nas vias aéreas é comum para a asma e para a rinite. Caracteriza-se pela sensibilização aos alergénios e posteriormente a resposta de hipersensibilidade imediata (minutos após a exposição ao alergénio) e tardia (4 a 12 horas após a exposição ao alergénio) (Rodrigues et al, 2008).

Na primeira exposição ao alergénio (sensibilização) este é apresentado pelas células dendríticas da mucosa nasal, aos linfócitos T (Th 2) que, por sua vez, vão estimular os linfócitos B a produzir IgE. A IgE circulante vai ligar-se aos receptores de alta afinidade (FcεRI) existentes nos mastócitos e basófilos. Nas exposições seguintes, o alergénio vai ligar-se directamente à IgE específica da superfície dos mastócitos, com consequente activação e desgranulação. Na resposta imediata, os mastócitos vão libertar mediadores pré-formados, como a histamina e outros, que vão ser sintetizados a partir do ácido araquidónico (leucotrienos, prostaglandinas, etc). Da libertação desses mediadores vão surgir os sintomas nasais, como espirros, rinorreia, prurido, congestão nasal e, da acção a nível brônquico, o broncoespasmo e o edema. Durante a resposta de hipersensibilidade tardia são libertadas citocinas (IL 4, IL 13, ...) e outras quimiocinas responsáveis por recrutar células inflamatórias, como eosinófilos e neutrófilos, que, por sua vez, libertam mais citocinas, perpetuando o processo inflamatório e conduzindo a inflamação da via aérea com obstrução nasal e brônquica (Rodrigues et al, 2008).

1.3. Polinose

Clinicamente, a polinose caracteriza-se pela rinoconjuntivite alérgica ou asma brônquica. Os pacientes manifestam prurido ocular com hiperemia conjuntival, coriza, espirros, prurido nasal ou faringo-palatal e ausência ou presença de obstrução nasal.

Uma das características da polinose é a periodicidade anual, uma vez que os sintomas ocorrem normalmente na mesma época do ano e coincidem com a polinização (Solomon, 1984). Alguns doentes sensibilizados a pólenes relatam sintomas característicos da alergia antes e depois do período de libertação dos Pólenes (Liccardi et al., 1996; Reinberg et al., 1988) e que se podem dever à presença de alergénios no interior das residências, provenientes da presença de outras fontes de aeroalergenos como animais domésticos, ou transportados para ali em roupas e outros objectos contribuindo, assim, para a manutenção deste ambiente de uma elevada concentração de alergénios (Fahlbush et al., 2000).

1.4. Pólenes e Alergénios

Os alergénios podem ter várias origens, encontrando-se divididos de acordo com as vias de exposição e incluem aeroalergénios (pólenes, ácaros de pó, esporos de fungos, pêlos de animais, matéria excretada por insectos e produtos químicos associados a bioaerossóis), alergénios alimentares, da picada de insectos, fármacos e látex. De entre estes grupos destacam-se os aeroalergénios, visto que estão associados ao aumento exacerbado das doenças alérgico-respiratórias nos países mais desenvolvidos (Behrendt et al., 2001; Weerd et al., 2002; Kowalski, 2006; Sofiev et al., 2006; Meltzer, 2007; Paul, 2008; Hamilton, 2010).

Os grãos de pólen mais abundantes em Portugal pertencem às famílias das *Poaceae*, *Oleaceae*, *Fagaceae*, *Pinaceae*, *Cupressaceae*, *Platanaceae* e *Urticaceae* sendo o grupo das gramíneas o principal causa de polinose em Portugal, tal como acontece em muitas outras regiões europeias nomeadamente de Espanha, Itália e França (Todo-Bom et al., 2006).

Os grãos de pólen dispersos ou transportados pelo ar, ditos anemófilos, são os de maior importância alergológica. Um grão de pólen pode ser transportado por 175km a uma velocidade média de 10m/s. O pólen permanece estável por séculos numa atmosfera seca (Stanley et al, 1974), sendo que alergénios de grãos de pólen secos ou desidratados mostram pouca actividade na matriz citoplasmática, mas forte actividade em organelos como mitocôndrias, partículas de polissacarídeos e grãos de amido. Acredita-se que os alergénios polínicos sejam extremamente solúveis em água, o que torna os alergénios prontamente disponíveis e capazes de provocar uma reacção alérgica mediada por IgE em segundos (Behrendt et al, 2001).

No que respeita à composição do pólen, esta é variável entre espécies. Os valores dos componentes oscilam entre 13 e 17% de hidratos de carbono, 11 e 20% de proteínas, 1 e 4% de lípidos e 1 e 2% de compostos inorgânicos. O conteúdo de água é relativamente elevado quando o grão de pólen está nas anteras, decrescendo

rapidamente aquando da ântese, tornando-se altamente higroscópico. A maioria das proteínas, normalmente enzimas, ocorre no citoplasma e na parede do grão de pólen, de modo a permitir o crescimento e alongamento do tubo polínico e subsequente fecundação. Contudo, esta disposição permite igualmente a interacção com o sistema imunitário (Camacho, 2007).

Porém, nem todos os grãos de pólen causam polinose, isto é, não são todos igualmente alergénicos, pois só determinadas espécies de plantas lançam para a atmosfera grãos de pólen com propriedades alergénicas. Geralmente, são as plantas anemófilas, embora as entomófilas, mais raramente, também possam causar sensibilizações alergénicas, visto que contêm, igualmente, proteínas com potencial antigénico. Muitos são os investigadores que têm relacionado a ocorrência de sintomas alérgicos respiratórios com a presença de grãos de pólen no ar, estando bem documentado que a inalação de pólen de determinadas espécies causa sintomas clínicos de alergia respiratória (Caeiro, 2007).

Os alergénios presentes nos grãos de pólen são, geralmente, glicoproteínas específicas com pesos moleculares baixos compreendidos entre 8-70 kDa cuja capacidade de interacção com o sistema imunitário e posterior desenvolvimento de reacções de hipersensibilidade tipo I depende da sua localização no grão de pólen, da rapidez de solubilização e, em consequência, do nível de hidratação, da sua estabilidade molecular e do reconhecimento dos constituintes proteicos pelo sistema imunitário humano (Barral et al., 2002; Weerd et al., 2002; Jiang et al., 2005; Kaliner et al., 2008).

Crê-se actualmente que os aeroalergénios polínicos estão essencialmente associados ao grão de pólen, sendo transportados por este (Buters et al., 2010), embora existam também algumas evidências de que estes possam estar presentes na atmosfera fora do grão de pólen, quer isoladamente quer adsorvidos a partículas submicrónicas (<10µm), sendo este último caso claramente maioritário (D'Amato et al., 2007), não havendo no entanto, consenso a respeito desta questão entre a comunidade científica. Em qualquer dos casos, o transporte destas proteínas ocorre essencialmente por acção do vento durante o período de polinização (Kowalski, 2006; Linares et al., 2007).

1.4.1. Nomenclatura e Classificação dos alergénios

O uso de uma nomenclatura preconizada é extremamente importante no estudo dos alergénios, sobretudo no desenvolvimento de mecanismos de diagnóstico específico e de extractos imunoterapêuticos com alergénios recombinantes (Chapman et al. 2000; Ferreira et al., 2004; Jutel et al., 2005). No sentido de padronizar a referência dos diversos alergénios descritos na literatura científica, o Subcomité de Nomenclatura de Alergénios da União Internacional das Sociedades de Imunologia, em parceria com a organização Mundial de Saúde, adoptou uma regra sistemática de nomenclatura (Marsh et al., 1986; King et al., 1994; King et al., 1995).

O sistema de nomenclatura dos alergénios foi estabelecido pela IUIS em 1978, baseando-se no nome taxonómico do género. Em geral, o nome do alergénio dispõe da seguinte ordem: as três primeiras letras indicam o Género, espaço, a primeira letra da espécie, espaço, e um número árabe que indica a ordem cronológica da purificação. Por exemplo, Par j 1, corresponde ao primeiro alergénio purificado de *Parietaria judaica*. (Camacho, 2007).

Os alergénios podem classificar-se como maioritários ou “major” e minoritários ou “minor”, por serem reconhecidos por, pelo menos, 50% ou 10% dos pacientes alérgicos daquela fonte alergénica, respectivamente. Na verdade, a relevância dos alergénios depende da proporção de pacientes que desenvolvem IgE contra estes (Camacho, 2007).

1.5. Factores ambientais que afectam as concentrações de pólen e de alergénios no ar

São vários os elementos meteorológicos que são decisivos para a presença do conteúdo de pólen no ar. A temperatura por exemplo actua positivamente sobre os níveis polínicos e vários estudos mostram que a variação horária está correlacionada

com a concentração de pólen no ar, ou seja, temperaturas mais elevadas maior a concentração de pólen.

Em relação às precipitações registadas em fases prévias à estação polínica estas intensificam as concentrações de pólen. Durante as etapas de libertação e dispersão, as chuvas bloqueiam essa libertação e exercem uma acção mecânica sobre as partículas aerobiológicas precipitando-as ao solo, limpando o ar atmosférico na Primavera/ Verão. A humidade favorece o desenvolvimento da planta e facilita a floração, contudo um aumento acima do limite específico impede a deiscência das anteras e reduz os níveis de pólen no ar.

No entanto o vento é, sem dúvida o factor mais importante em todo o processo, pois ao passar sobre uma determinada vegetação, poderá provocar uma nuvem composta por Pólenes provenientes dessa mesma, que serão transportados para um determinado sitio conforme a direcção do vento tendo uma clara influência sobre as amostras de pólen recolhidas nos captadores polínicos. No que respeita à velocidade, se esta for grande vai haver uma diluição do conteúdo polínico, mas a eficiência na recolha será reduzida, mas se for excessivamente baixa, as anteras não balançam impedindo que estas libertem pólen, retardando a dispersão polínica.

Por outro lado, o vento favorece o levantamento de pólen já sedimentado, incorporando na atmosfera tipos polínicos que já finalizaram o seu período de polinização, o que em determinadas ocasiões se traduz num período post-pico mais prolongado.

1.6. Caracterização do pólen e dos alergénios das *Gramíneas*

Os pólenes de gramíneas são a principal fonte de aeroalergénios em ambiente exterior em climas temperados e frios, sendo o seu papel extensivamente conhecido e documentado (Knox et al, 1996). O pólen das gramíneas é a principal causa de sensibilidade alérgica ao ar livre em toda a Europa (Burbach et al., 2009).

As gramíneas são uma vasta família de angiospérmicas (plantas com flor), taxonomicamente designada por *Poaceae* (*Gramineae*), de distribuição cosmopolita.

Embora a diversidade de espécies que pertencem a este grupo seja enorme, cerca de 10000 espécies distribuindo-se por cerca de 650 géneros, entre elas, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata* e *Cynodon dactylon* (Knox e tal., 1996; Suphioglu, 2000, Weber, 2003). O pólen de diferentes gramíneas é microscopicamente indistinguível. A quantidade de alérgeno libertado, contudo, varia entre espécies (Duffort et al., 2008).

Grande parte das gramíneas que se observam em Portugal é anual e tal justifica-se em parte pela resposta ao clima mediterrânico que caracteriza boa parte do país.

De entre os pacientes alérgicos no mundo, pelo menos 40% estão sensibilizados a alérgenos de Pólenes de gramíneas (Anderson et al, 2003). Isto deve-se, por um lado, ao carácter alérgico de muitas espécies que partilham em comum antigénios e provocam sérios sintomas alérgicos a indivíduos sensíveis e, por outro lado, à capacidade que possuem de colonizar diferentes ecossistemas e de ocupar extensas áreas de solo, graças à sua grande capacidade de reprodução. Daí que seja tão importante o conhecimento dos níveis de *Poaceae* para os profissionais de saúde e pacientes (Caeiro, 2004).

Em Portugal a floração acontece praticamente durante todo o ano, preferencialmente de Janeiro até Julho. Porém, a maioria das espécies florescem de Março a Junho (Caeiro, 2004).



Figura 3. Pólen de *Poaceae* (Retirado de Caeiro, 2004)

As espécies mais importantes são o *Lolium perenne*, *Poa pratensis* e *Phleum pratense*, mas outras espécies podem ser importantes clinicamente dependendo da região geográfica (Bass et al., 2000; Davies et al., 2005).

Devido à homologia estrutural, similaridades imunoquímicas e reactividade cruzada entre epítomos, os alergénios de pólen de gramíneas são classificados em grupos de acordo com o IUIS (King et al., 1995). De uma maneira geral, treze grupos de alergénios de pólen de gramíneas já foram descritos. No quadro 1 estão relacionadas algumas espécies de gramíneas da família *Poaceae* de importância clínica e seus principais alergénios.

Gramíneas da família Poaceae e seus alérgenos			
<i>Lolium perenne</i>	Mr (kDa)	<i>Phleum pratense</i>	Mr (kDa)
Lol p 1	35	Phl p 1	27
Lol p 2	11	Phl p 2	10-12
Lol p 3	11	Phl p 4	55
Lol p 4	50-60	Phl p 5	32-38
Lol p 5	28-32	Phl p 6	13
Lol p 10	12	Phl p 7	6-8
Lol p 11	16	Phl p 12	14
		Phl p 13	55-60
<i>Poa pratensis</i>		<i>Dactylis glomerata</i>	
Poa p 1	33	Dac g 1	32
Poa p 5	28-34	Dac g 2	11
Poa p 10	12	Dac g 3	14
		Dac g 5	31
<i>Phalaris aquatica</i>		<i>Cynodon dactylon</i>	
Pha a 1	34	Cyn d 1	31-32
Pha a 5	31-33	Cyn d 7	12
		Cyn d 12	14

Quadro 1. Relação de gramíneas que produzem pólenes alergénicos da família *Poaceae*, de acordo com seus respectivos alergénios e massa molecular relativa (Mr) (retirado de Suphioglu, 2000, com modificações).

Do ponto de vista clínico, alergénios do grupo 1 são os mais importantes, reconhecidos por aproximadamente 95% de todos os pacientes sensibilizados a pólenes de gramíneas, seguidos pelos do grupo 5, registando-se sensibilização em cerca de 85% dos pacientes (Weber, 2003).

O pólen de *Phleum pratense* é uma fonte alergénica comum. É, de facto, uma das causas mais frequentes de alergia respiratória no mundo ocidental, induzindo

rinite sazonal, conjuntivite e asma em indivíduos sensibilizados (Gavrovic et al., 1997). O conteúdo proteico do pólen da *P. pratense* varia de época para época, o qual tem impacto na quantidade alergénica total à qual os indivíduos sensibilizados estão expostos (Gavrovic et al., 1997).

O Phl p 1 apresenta duas isoformas de 35 e 37 kDa e a sua actividade biológica foi demonstrada pela libertação de histamina e através de testes cutâneos. O Phl p 4 é um alergénio *major* resistente à tripsina (Fischer et al., 1996). O Phl p 5 é o alergénio dominante da *P. pratense* e consiste em duas isoformas que possuem PM de 38 kDa (Phl p 5a) e 32 kDa (Phl p 5b) e cujo cADN foi pela primeira vez identificado por Vrtala et al. (Vrtala et al., 1998). Alguns estudos já demonstraram que o alergénio Phl p 5a tem predominantemente uma estrutura secundária helicoidal (Flicker et al., 2000). Cada isoforma está dividida em, pelo menos, 4 isoalergénios (Becker et al., 1995), os quais possuem uma elevada homologia sequencial e actividades alergénicas semelhantes (Neerven et al., 1998). As células T específicas para Phl p 5 são altamente heterogéneas (Wurtzen et al., 2001).

Para além disso, nem todas as espécies de gramíneas são igualmente alergénicas (Taketomi et al., 2006), daí que a abundância de pólen no ar possa nem sempre corresponder a um aumento do risco de desenvolvimento de polinose. Assim, a monitorização do pólen da gramínea é um enorme avanço no que respeita à aerobiologia. O Phl p 5 mesmo que não seja realmente o maior alergénio, no que respeita ao pólen das gramíneas, comparando com o Bet v 1 da Bétula, é sem dúvida o maior (um vez que é um alergénio com mais de 50% de reactividade alérgica em indivíduos). O Phl p 5 é no entanto considerado o melhor marcador de sensibilidade ao pólen de Poaceae (Duffort et al., 2008).

1.7. Caracterização do pólen e dos alergénios da *Olea europaea* L.

O pólen de *Olea*, juntamente com o pólen de *Poaceae*, constitui-se como uma das mais importantes causas de polinose na bacia Mediterrânica, abrangendo o Sul de

Espanha e de Portugal (Feo, 2000). A família das *Oleaceas* (*Oleaceae*) é a principal da ordem das Lamiales e engloba 600 espécies agrupadas em 29 géneros (Feo, 2000).

O pólen de oliveira é um dos mais importantes do ponto de vista alergológico na Europa Mediterrânica, onde a sensibilização a este pólen é uma das causas mais frequentes de doenças alérgicas (Hernández et al., 2010). Em concordância, no Sul de Portugal, no Alentejo, este pólen é considerado a segunda causa mais importante de polinose (Caeiro, 2004).

O período de polinização desta espécie é muito curto e intenso, o seu pólen encontra-se na atmosfera principalmente entre Maio e início de Junho e, durante esse período, são libertadas grandes quantidades de pólen (Caeiro, 2004; Ferro, 2010).

Estão actualmente descritos 13 grupos de alergénios do pólen de *O. europaea* (www.alergome.org, consultado em Outubro de 2011). Os estudos bioquímicos e moleculares já efectuados apontam para a existência de uma mistura complexa de proteínas alérgicas presentes no grão de pólen de oliveira. A maioria dos alergénios existentes neste pólen foram, até ao momento, caracterizados e isolados em maior ou menor extensão alergénios, Ole e 1 a Ole e 13, (Rodríguez et al., 2007; Gaussorgues, 2009).

Ole e 1 foi o primeiro alergénio a ser purificado a partir da *Olea europaea* e representa mais de 10% do teor proteico do seu grão de pólen. É descrito como a principal proteína alérgica uma vez que mais de 70% dos pacientes alérgicos ao pólen de oliveira apresentam sensibilidade a este alergénio (González et al., 2002; Rodríguez et al., 2007).



Figura 4. Pólen de *Olea* (retirado de Caeiro, 2004)

Sabe-se que é constituída por 145 aminoácidos, que se encontra no pólen mas que não existe nos frutos, folhas, e caules, facto que torna estes tecidos não indutores da polinose causada pelo pólen de Oliveira. Ole e 1 é principalmente armazenado nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso porém estando o pólen em estágio de maturação, as cisternas são transformadas em pequenas vesículas que se dispersam pelo citoplasma. Também durante este estágio, Ole e 1 pode ser encontrada na exina (membrana externa) do grão de pólen onde desempenha uma função importante relacionada com a hidratação e germinação do grão de pólen (Napoli et al., 2008; Kaliner et al, 2008).

O Ole e 1 é uma proteína polimórfica ácida (pI=5,2) que apresenta duas variantes: uma não glicosilada (18,5 kDa) e outra glicosilada (22 kDa). A glicosilação ocorre num resíduo de asparagina, Ans111 (Castro et al., 2009).

O mapa antigénico da proteína Ole e 1 identifica três regiões que podem ser consideradas como epitopos de reconhecimento para células T nas posições 111-113, 91-102 e 109-130 da cadeia polipeptídica, tendo-se confirmado que a união deste alergénio com a IgE específica se realiza pela estrutura conformacional e não sequencial (González et al. 2006; Ferro, 2010).

Existem outros alergénios major no pólen de *Olea* e que são: Ole e 1, Ole e 2, Ole e 6, Ole e 7, Ole e 9 e Ole e 10 (Carbada et al, 2007, Quiralte et al, 2007). A maioria dos pacientes são sensíveis a mais de um dos alergénios referidos e embora a sensibilidade da Ole e 10 pareça estar associada a sintomas mais severos, os pacientes também sensíveis à Ole e 1 (Quiralte et al, 2007) sendo esta de longe a mais representativa (96%) da população (Quiralte et al, 2007). Além disso, a Ole e 1 pode variar entre cultivares (Alche et al, 2007), registando também variações temporais anuais e geográficas (C. Gálan, C. Antunes e R. Brandão, observações não publicadas). Deste modo a *Ole* e 1 é, de entre os aeroalergénios de oliveira, o maior e o mais expressivo em termos de impacto que representa para a saúde pública.

Oliveira da família <i>Oleaceae</i> e seus alérgenos	
<i>Olea europaea</i> L.	Mr (Da)
Olea e 1	16.330
Olea e 2	14.489
Olea e 3	9.356
Olea e 4	2.711
Olea e 5	3.104
Olea e 6	5.833
Olea e 7	2.199
Olea e 8	18.907
Olea e 9	48.838
Olea e 10	12.878
Olea e 11	39.667
Olea e 12	34.068
Olea e 13	24.727

Quadro 2. Pólenes alérgenos da família *Oleaceae*, de acordo com os seus respectivos alérgenos e massa molecular relativa (Mr) (informação retirada de www.allergome.org a Outubro de 2011).

1.8. Relação entre pólen, alérgeno e reacção a Testes Cutâneos

Na polinose, a profilaxia é particularmente difícil. Evitar ou diminuir a exposição ao meio externo é complicado devido à necessidade de permanência dos indivíduos no meio ambiente exterior em actividades de trabalho e lazer (Fahlbusch et al., 2000).

Para além disso, os extractos brutos de pólenes e podem apresentar potência alérgica variável conforme as condições ambientais de cultivo das plantas (Arilla et al., 2001), do grau de maturação dos grãos de pólen, do procedimento de extracção (Mistrello et al., 2002) e da estabilidade do extracto (Niederberger et al., 1998; Niemeijer et al., 1996).

Assim, esses extractos contêm uma mistura complexa de proteínas, muitas delas desconhecidas, das quais somente algumas tem actividade alérgica (Arilla et al., 2001) e em muitos casos, importantes alérgenos podem estar ausentes ou mesmo em baixa concentração ou ainda apresentarem diferentes concentrações em extractos comerciais de uma mesma empresa ou entre empresas (Valenta et al, 2007).

A confirmação da sensibilização a um ou mais pólenes é evidenciada pela presença de IgE específica, objectivada nos resultados positivos dos testes cutâneos ou determinações séricas correspondentes. O diagnóstico é, então, estabelecido pelo médico assistente, valorizando os resultados obtidos em função da história clínica e determinando a relevância clínica da sensibilização encontrada.

1.9. Monitorização de Bioaerossóis

A avaliação quantitativa de bioaerossóis tornou-se importante devido a uma série de aplicações na saúde e na indústria (Camacho, 2007).

Os bioaerossóis ocorrem no ambiente “indoor” e “outdoor”, formando normalmente misturas complexas de variados componentes e apesar de existirem várias tecnologias e métodos precisos de medição das emissões de aerossóis, a grande dificuldade deve-se sobretudo à diversidade de organismos que podem ocorrer numa dada quantidade de ar (Camacho, 2007).

A partir de finais dos anos 80, Brandão e Lopes (1990) iniciaram análises aeropalinológicas dos principais centros urbanos do sul de Portugal, inicialmente por métodos gravimétricos (Durham-modificado) e posteriormente volumétricos (sistemas tipo Hirst) (Brandão et al., 2004). Durante os anos de 1999 e 2000 funcionou em Portugal uma rede de monitorização polínica assente no método Cour e que abrangeu a quase totalidade das capitais de distrito (Camacho, 2007).

Através da SPAIC foi possível estabelecer as condições para a elaboração de um Calendário Polínico Nacional. Em 2002 foi criada a Rede Portuguesa de Aerobiologia (RPA) cujo centro coordenador se situa em Évora, integrando até ao presente a informação dos 7 postos de captação a operar ininterruptamente e que são: Porto, Coimbra, Lisboa, Évora, Portimão, Ponta Delgada e Funchal (Camacho, 2007).

A RPA, tal como as restantes redes europeias, adoptou a metodologia de monitorização recomendada pela Rede Europeia de Aerobiologia, disponibilizando

através dum portal on-line as previsões polínicas dos 8 dias seguintes, bem como a distribuição polínica total dos postos de recolha. (Camacho, 2007).

No caso específico de Évora, os estudos demonstraram que entre 2009 e 2010, se registou uma variação inter-anual quer do perfil quer da duração da época polínica. O conteúdo polínico total no ar atmosférico variou no intervalo de 5643 a 17107 e 7240 a 12524grãos/m³, no que respeita às *Poaceae* e a *Olea* respectivamente. (Lopes et al., 2011; Ferro et al., 2011)

1.10. Métodos para Detecção e Quantificação de antigénios

Os métodos imunológicos representam uma classe de técnicas de concentração de proteínas, principalmente proteínas do sistema imunitário, com alta especificidade e confiabilidade. Essa técnica imunológica utiliza anticorpos específicos para proteína de interesse com formação de complexo proteico rapidamente detectável (Dias, 2009). Estes podem ser qualitativos, usados apenas na detecção de antigénios específicos, semi-quantitativos, utilizados na detecção e avaliação da abundância relativa de um determinado antigénio e quantitativos, permitindo efectivamente quantificar antigénios específicos com recurso a curvas padrão (Emon, 2007; Ferro, 2010).

Resumidamente, as vantagens destes métodos estão relacionadas com a sua sensibilidade, especificidade, facilidade de uso e permitem a quantificação de uma enorme variedade de proteínas, contudo, são bastante dispendiosos devido aos elevados custos dos reagentes e equipamentos de análises (Levetin, 2004; Emon, 2007).

No que respeita à análise dos aeroalergénios a partir de extractos obtidos de grãos de pólen ou no soro dos pacientes os métodos a que mais se recorre têm sido o *immunoblott*, para identificação e avaliação semi-quantitativa da reactividade e as técnicas de ELISA, actualmente para quantificação de aeroalergénios (Ferro, 2010). Neste último, o diferencial encontra-se na forma de ligação do antigénio e preso a uma superfície (geralmente de poliestireno) através de um anticorpo. Uma vez que esta

reação é sobretudo enzimática, torna possível a detecção de quantidades muito reduzidas de antígeno, aumentando assim a sensibilidade da técnica (Dias, 2009).

Existem quatro tipos principais de ELISA: ELISA directo, ELISA competitivo, ELISA indirecto e ELISA sanduíche, podendo haver interacção entre as diferentes técnicas (Dias, 2009).

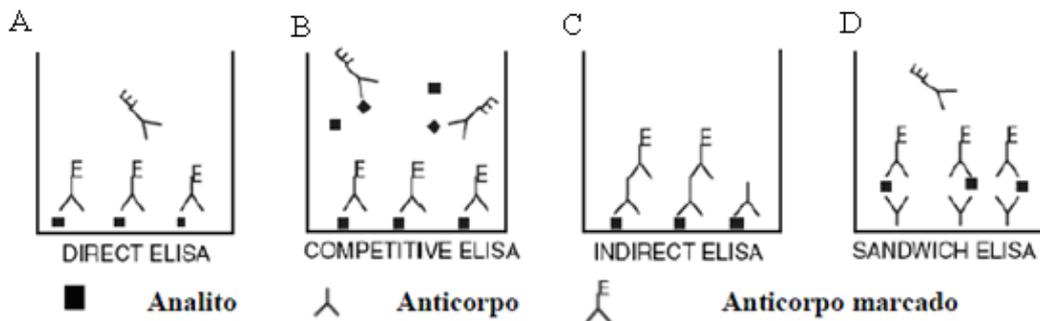


Figura 5. Exemplos de formatos de ELISA. (adaptado de Dias 2009).

Assim e definindo:

- ELISA directo: os antígenos específicos revestem o interior dos poços, depois adicionam-se anticorpos marcados com enzimas. Se o anticorpo reage com antígeno, o complexo ficará solubilizado. De seguida adiciona-se o substrato que seja capaz de actuar na enzima marcadora (fig.5 A) (Dias, 2009; Hernández, 2010).
- ELISA competitivo: anticorpos específicos revestem os poços da placa, depois adiciona-se uma concentração conhecida de uma mistura de antígeno do anticorpo anterior, ligados a uma enzima e antígenos sem enzima. Depois adiciona-se o substrato. Prepara-se uma leitura colorimétrica comparativa de ambas as provas. Se a leitura for análoga, o antígeno estudado não apresenta ligação com os anticorpos empregados. Se há diferença nas leituras, o antígeno em estudo está relacionado sorologicamente ao anticorpo usado e a diferença na densidade óptica é proporcional à concentração do antígeno problema (fig.5 B). (Dias, 2009; Hernández 2010).

- ELISA indirecto: reveste-se os poços da placa com antígenos específicos. Adiciona-se a solução com antígeno para que os anticorpos pesquisados reajam especificamente com os antígenos dos poços. Adiciona-se o anti-anticorpo conjugado com uma enzima, os quais vão reagir com anticorpos específicos adicionados na etapa anterior e que se encontram fixados aos antígenos. Por fim, adiciona-se um substrato capaz de actuar na enzima marcadora (fig.5 C) (Dias, 2009; Hernández, 2010).
- ELISA sanduíche (dois anticorpos): os poços são revestidos por anticorpos específicos para o que se deseja analisar. Adiciona-se a amostra contendo substância de interesse e se o antígeno que se quer detectar estiver presente, reagirá com o anticorpo. Adicionam-se anticorpos específicos ao antígeno que se deseja detectar, mas diferente dos anticorpos que se colocou para revestir, de seguida adiciona-se a enzima. E por ultimo o substrato para determinar a cor (fig.5 D) (Dias 2009, Hernández 2010).

Considera-se, então, o método ELISA o mais vantajoso dos métodos imunológicos, uma vez que os rádio-isótopos utilizados em RIA são substituídos por uma vasta gama de enzimas (ureases, fosfatase alcalina, peroxidases e β -galactosidases) que em contacto com um substrato adequado originam um produto corado que pode ser quantificado por espectrometria de absorção molecular. Distingue-se, ainda, de outros EIA pois neste acontece a ligação por adsorção de um dos reagentes a uma fase sólida que normalmente corresponde à superfície de uma microplaca de 96 poços e cuja utilização contribui para o sucesso do método, dotando-o da possibilidade de analisar muitas amostras em simultâneo e de facilitar a automação dos ensaios. Supõe-se que o método ELISA se mantenha na liderança por se considerar uma alternativa viável, uma vez que é simples, de curta duração, específico e sensível (Dias, 2009; Ferro, 2010).

O tipo de ensaio ELISA escolhido para quantificação do aeroalergénio Phl p 5 e Ole e 1 foi o ELISA *sandwich* visto que em estudos anteriores foi preciso, reprodutível e específico. Verificou-se ainda que cerca de 90% destes dois alergénios foram encontrados na fracção de bioaerossóis de $PM > 10 \mu m$ e, em ambos, o conteúdo foi directamente proporcional ao número de grãos de pólen no ar atmosférico,

encontrando-se uma correlação positiva entre os valores diários dos dois parâmetros.
(Lopes et al, 2011; Ferro et al, 2011)

2. PROBLEMÁTICA

A alergia ao pólen tem tido um grande impacto por toda a Europa, havendo sinais indicadores do seu aumento nas últimas décadas, principalmente no que diz respeito a reacções alérgicas respiratórias (D'Amato et al.2007). Como já se referiu estima-se que em Portugal, um terço da população seja susceptível a alergias (segundo a Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica), as quais se apresentam principalmente sob a forma de asma, rinite, dermatite atópica, entre outras (Lemanske- Júnior et al, 2003).

As plantas anemófilas são uma das principais fontes de aeroalergénios, sendo que, na Europa, as espécies mais importantes pertencem às famílias das *Poaceae*, *Oleaceae* e *Betulaceae*, e ao género *Ambrosia*. De entre estas, as plantas da família *Poaceae* são das principais fontes de alérgenos, devido à sua distribuição mundial e à sua elevada capacidade de produção de pólen e da sua libertação para a atmosfera. Em todo o mundo, pelo menos 40% dos pacientes alérgicos são sensíveis a alérgenos de pólen de gramíneas (Taketomi et al, 2006). Tem-se conhecimento de que a exposição aos alérgenos representa um factor-chave entre os determinantes ambientais da asma e rinite alérgica, embora não se possam excluir outros factores como os factores genéticos e a poluição do ar, elemento co-adjuvante no desenvolvimento e na gravidade das manifestações da doença (D'Amato et al.2007). Dependendo da área geográfica, as espécies clinicamente significativas podem variar, porém, entre as espécies mais importantes estão *Lolium perenne*, *Poa pratensis* e *Phleum pratense* (Taketomi et al. 2006). Em Portugal os grãos de pólen com frequências mais elevados incluem os de gramíneas e oliveira (SPAIC, 2011).

Os alérgenos são, na maioria dos casos, glicoproteínas que se tornam facilmente disponíveis biologicamente e são capazes de provocar uma reacção alérgica, mediada por anticorpos IgE (Taketomi et al. 2006). O Phl constitui a família de proteínas mais alergénica do pólen de gramíneas. Destas o Phl p 5 é o principal alérgeno presente e é um dos factores etiológicos mais responsável pelas rinites (rinite alérgica sazonal) e asma brônquicas, que atingem 80 a 90% das crianças e

adolescentes, e 40 a 50% dos adultos já asmáticos (Rajo et al., 2009). A par do pólen das gramíneas, a polinização da oliveira é uma das maiores causas da alergia respiratória nos países mediterrânicos (onde se inclui Portugal) (Tereja et al., 1999). Mais de 70% dos alérgicos ao pólen de oliveira apresentam reacção positiva a Ole e 1, a glicoproteína mais abundante do grão de pólen e o alergénio que mais significativamente contribui para o grau de alergenidade deste pólen (Tereja et al., 1999, González et al., 2002).

Os alergénios das gramíneas e da oliveira representam, daquele modo, um factor de risco acrescido para pacientes que padecem de outras doenças respiratórias (Rajo et al., 2009), crescendo por isso a necessidade de monitorização nos países mediterrânicos. Estes, em conjunto com a identificação da sensibilização mais prevalente, poderão contribuir de forma directa ou indirecta para o desenvolvimento de novas estratégias, nomeadamente ao nível de diagnóstico, terapêutica e prevenção da doença alérgica respiratória, permitindo melhorar os cuidados de saúde à população nacional resultando numa significativa melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

3. OBJECTIVOS CIENTÍFICOS

A realização deste trabalho tem como objectivo principal estudar a sensibilização a proteínas do *Phleum pratense* e *Olea europea* em doentes das consultas externas de Imunoalergologia de Hospitais do distrito de Évora.

Especificamente, pretende-se:

- 1- Quantificar os alergénios Phl p 5 e Ole e 1 pelo método imunoquímico (ELISA) em 2011.
- 2- Determinar o perfil de distribuição de aeroalergénios Phl p 5 e Ole e 1 ao longo da estação polínica.
- 3- Avaliar a correlação entre os perfis de distribuição de aeroalergénios Phl p 5 e Ole e 1 com os pólenes de *Poaceae* e *Olea*, respectivamente.
- 4- Estudar a sensibilização de pacientes dos distritos de Portalegre e Évora a proteínas de *Phleum pratense* e *Olea europea*.
- 5- Avaliar a correlação entre a sintomatologia e a concentração de pólen e/ou alergénios Phl p 5 e Ole e 1 no ar atmosférico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da população e determinação da sensibilização

O trabalho iniciou-se com o estudo da sensibilização dos pacientes às proteínas das espécies *Phleum pratense* e *Olea europea* que frequentam as consultas externas de imunoalergologia dos Hospitais do distrito de Évora. Para isso foram realizados testes cutâneos de Prick modificado ao *Phleum* total e *Olea* total, e especificamente ao Phl p 5 e Ole e 1, e disponíveis comercialmente. Esta parte concretamente foi da responsabilidade dos técnicos de saúde sob a coordenação da Dra. Luísa Lopes, imunoalergologista responsável das consultas.

4.1.1 Testes cutâneos de Pricks

Para a realização do teste utilizou-se extracto bruto de pólen de *Phleum pratense* e extracto bruto de *Olea europea* L. Deste modo, o teste concretizou-se pela deposição de uma gota de cada extracto alergénico na face interna do antebraço, após antissepsia do mesmo com etanol a 70%, distanciando 4 cm uma da outra. Sobre a gota depositada foi feita uma picada com uma lanceta estéril de metal ou plástico.

Em todos os testes, foram utilizados controlo positivo (histamina a 10mg/mL) e controlo negativo (solução salina fisiológica fenolada a 0,5 % e glicerizada a 50 %). A leitura da reacção foi feita passados 15 minutos, com auxílio de uma régua específica graduada em milímetros (mm). Uma reacção positiva ao teste caracteriza-se pelo aparecimento de uma pápula de cor amarelada pálida (edema) com uma auréola vermelha circundante (eritema). As reacções cutâneas ao teste, que se desenvolvam

com a mesma extensão que com a solução de histamina, são classificadas de grau +++. Reacções mais fortes são, por consequência, classificadas com o grau +++, as mais fracas como + ou ++. A reacção ao controlo negativo é registada com \emptyset .



Figura 6. Teste cutâneo de Prick (retirado de publica.opovo.com.br)

4.2. Monitorização do bioaerossól

O método de obtenção de amostras é escolhido consoante a finalidade do estudo, empregando-se normalmente um ou vários métodos de amostragem (Lee et al, 2004). O aparelho de captação escolhido foi um colector de impacto, onde a amostragem das partículas ocorre por colisão contra uma superfície de recolha sólida.

O método é qualitativo e quantitativo e em que se analisam as amostras visando a identificação das partículas por características como forma e tamanho das mesmas e posterior calculo das respectivas frequências. É aplicável apenas a partículas de maiores dimensões como pólenes e esporos porque a identificação é por microscopia óptica. Partículas abaixo do poder de resolução do microscópio não são detectáveis. O colector de impacto utilizado para a recolha das amostras polínicas de ar exterior assentou na metodologia de Hirst.

4.2.1. Colector Volumétrico de Tipo Hirst

A amostragem realizada através deste tipo de colector baseia-se na sucção de um fluxo de ar de 10 L/min através de uma unidade de impacto que diz respeito a um orifício (14mm x 2mm) e de um suporte circular (tambor) munido de uma cinta Melinex impregnada com silicone onde ficam retidas as partículas. Este suporte circular encontra-se ligado a um relógio com um mecanismo giratório que possibilita a sua passagem pelo orifício a 2 mm/h permitindo, assim, discriminar o tempo de amostragem (Ferro, 2010; Hernández, 2010).

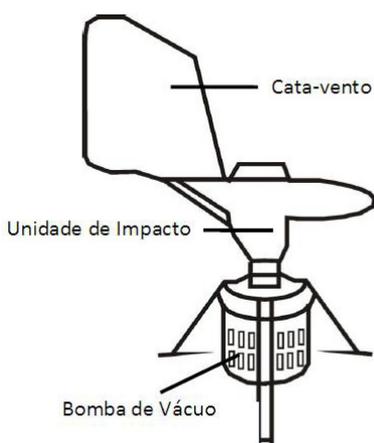


Figura 7. Coletor de impacto do tipo Hirst (retirado de Ferro, 2010).

4.2.2 Colectores de Impacto para Bioaerossóis

O tipo de colector de impacto utilizado neste estudo foi o Rupprecht and Patashnick ChemVol®2400 high-volume cascade impactor (Albany, NY, USA) que está ligado a uma bomba digital com um fluxo de 800L/min que garante a sucção das partículas presentes no ar atmosférico exterior. Essas partículas ficam retidas em filtros de poli-uretano, sendo estes de vários tamanhos (XL, M, S) e em que as

partículas (p) ficam então retidas de acordo com as suas dimensões. Assim, $p > 10 \mu\text{m}$ ficam retidas no filtro XL, $10 \mu\text{m} > p > 2,5 \mu\text{m}$ ficam no filtro M enquanto o filtro S captura partículas de dimensões compreendidas entre $2,5 \mu\text{m} - 0,25 \mu\text{m}$ (Buters et al., 2010).

Este colector de impacto é usado em determinadas aplicações nomeadamente:

- Obtenção de amostras das partículas por fracções e tamanhos.
- Caracterização química
- Determinação da toxicidade
- Identificação das partículas

O sistema é então composto por um CHEMVOL-Sampler, tripé, ventilador de alta capacidade e um tubo com interligação com o ar.



Figura 8. CHEMVOL-Sampler e os vários tamanhos de filtros (adaptado de <http://www.bgiusa.com>)

Ainda assim, os filtros de poli-uretanos trazem algumas vantagens:

- Ao serem de uma espécie de esponja amortecem a colisão das partículas, bem como a porosidade do material permite fixar partículas de várias dimensões, ou seja, possui uma alta capacidade de colheita.
- A durabilidade é maior em relação aos outros tipos de filtros, bem como a capacidade de carga é maior. E uma vez que a taxa de fluxo é de 800 l/min , uma grande quantidade de partículas pode ser colhida para amostragem, facilitando a recuperação de partículas para a análise.
- As amostras podem ser facilmente colhidas com pequenas quantidades de águas ou solventes orgânicos.

- São inertes, e são o meio adequado para eventuais análises químicas, toxicológicas e físicas.
- A análise das amostras é feita através de métodos imunoquímicos, sendo estes específicos para quantificação das fracções proteicas alergénicas provenientes dos pólenes.

4.3 Recolha de alergénio em ar atmosférico e preparação das amostras

A recolha e preparação das amostras iniciou-se com:

- Recolha de ar atmosférico, durante a estação polínica, contendo os pólenes das gramíneas e da oliveira (normalmente entre Abril e Julho). Esta recolha foi efectuada utilizando o referido colector de partículas que se encontrava num local bem arejado e aberto para que a captura do ar fosse eficaz;
- Os filtros foram conservados a -70°C até ao momento da extracção e preparação das amostras, permitindo a recolha da fracção proteica,
- Os extractos foram, seguidamente, liofilizados e conservados a -70°C para posterior análise;



Figura 9. Colector de impacto Rupprecht and Patashnick ChemVol®2400 high-volume cascade impactor (Albany, NY, USA) equipado com dois filtros

4.4 Preparação dos Filtros de poli-uretano para Utilização no CHEMVOL-Sample

- Os filtros foram prévia e devidamente lavados para se evitarem falsos positivos, durante a quantificação do aeroalergénio, resultantes de compostos químicos eventualmente existentes nos mesmos;
- Foram colocados em recipientes contendo tampão Bicarbonato de Amónio 0,1M (pH 8,11) (Sigma-Aldrich) e postos a agitar durante 1 hora a 6 rotações por minuto (rpm), foram depois mergulhados 3 vezes em água bidestilada;
- Colocaram-se, novamente, os filtros em recipientes limpos com água bidestilada durante uma hora e sujeitaram-se os mesmos a agitação (6 rpm).
- Depois colocaram-se numa estufa a 37°C durante 4 dias;
- Por último, armazenaram-se os filtros em sacos devidamente identificados (data, n.º do filtro, alergénio(s) a quantificar, local da recolha até à data de utilização;

Durante todo o processo de lavagem e armazenamento evitou-se a exposição dos filtros à luz solar uma vez que a radiação os pode danificar.

4.5 Substituição dos Filtros de poli-uretano no CHEMVOL-Sampler

A substituição dos filtros é feita do seguinte modo:

- Em primeiro lugar, desligou-se a bomba digital DHM 60 do Chemvol-Sampler;
- Retirou-se a campânula do tripé e colocou-se numa bancada firme, depois abriu-se a campânula ao meio, ficando-se com duas partes, de modo aos os filtros XL e M ficarem visíveis;
- Com o auxílio de luvas e pinças retiraram-se os filtros, sendo estes divididos em três partes. Cada parte foi colocada em tubos de Falcon de 50 mL devidamente identificados com o número do filtro, o nome dos alergénicos a quantificar, o local de recolha, a data em que o filtro foi colocado no Chemvol-Sampler;



Figura 10. Mudança dos filtros XL e M

- Foram depois armazenados a -80°C ;
- Para finalizar foram colocados os novos filtros no interior da campânula (com luvas e pinças para que não haja contaminações). Encaixaram-se as duas partes da campânula e colocaram-se de novo no tripé, ligando a bomba digital DHM 60;

Os filtros foram substituídos a cada 24 horas de utilização, mais concretamente ao meio-dia, de cada dia.

4.6 Extração da fracção proteica e preparação dos extractos

- O conteúdo proteico presente nos filtros foi extraído com tampão Bicarbonato de Amónio 0,1 M (pH 8.1) suplementado com 0,1% de BSA (Sigma). Foram adicionados 15 e 6 mL aos tubos de Falcon que continham os filtros XL e M;
- Estes foram, posteriormente, submetidos a agitação por inversão num *Rotating head-over-head* a 60 rpm durante 4 horas e protegidos da luz;
- De seguida, foram centrifugados a 1000g durante 5 minutos à temperatura ambiente, transferindo-se o sobrenadante para tubos de Falcon de 15mL e procedendo-se a nova centrifugação, 4000g durante 10 minutos a 4°C;
- Sendo o sobrenadante alíquotado de acordo com as seguintes condições:
 - Filtros XL: 4 alíquotas de 2,5 mL às quais foram adicionados 2 µL de BSA 10% e 2 alíquotas de 2 mL sem BSA.
 - Filtros M: 2 alíquotas de 2,5 mL às quais foram adicionados 2 µL de BSA 10%.
- As alíquotas foram armazenadas a -80°C;
- Posteriormente foram submetidas a liofilização durante 48 horas. O liofilizado foi armazenado até à análise também -80°C.

4.7 Quantificação dos alergénios Phl p 5 e Ole e 1 por ELISA

O ELISA é actualmente o método imunoquímico mais promissor para a quantificação de alergénios e, conseqüentemente, o adoptado neste trabalho para a determinação do Phl p5 e do Ole e 1. Neste caso, fez-se recurso a um método “*Sandwich*” assimétrico que se baseia na captura do alergénio com anticorpos monoclonais, seguido da detecção com um anticorpo secundário mono ou policlonal marcados com biotina (Weber; Arrila et al., 2002). A este complexo, adicionou-se um conjugado (estreptavidina-peroxidase) o qual, em sequência de adição de um substrato, originará um produto corado quantificável por espectrometria de absorção molecular e cuja concentração é proporcional à concentração de alergénio presente na amostra

4.7.1 Ligação do anticorpo à fase sólida

O ensaio iniciou-se com o revestimento dos poços das microplacas de poliestireno com uma solução contendo o anticorpo monoclonal (cada placa com o seu anticorpo, nomeadamente o Phl p 5 e Ole e 1) sendo ambos diluídos em tampão de revestimento, e de seguida adicionou-se 100 µL da solução de anticorpo a cada compartimento da placa, seguindo-se um período de incubação *overnight* a 4°C.

4.7.2 Lavagem das placas

A etapa de lavagem teve como objectivo remover as partículas e os anticorpos que não ficaram adsorvidos à fase sólida. O procedimento experimental envolveu, normalmente, três lavagens dos poços entre cada etapa com solução salina de fosfato

com 1% de Tween (PBS-T). Após a lavagem, as placas foram invertidas sobre papel absorvente de forma a eliminar a totalidade da solução de lavagem.

4.7.3 Saturação da placa com BSA

A saturação da placa realizou-se com o intuito de eliminar as possíveis ligações inespecíficas de componentes do ensaio como antigénio ou do anticorpo secundário à placa. Deste modo, adicionaram-se 100 µL de PSB-T suplementado com 1% de BSA (tampão de bloqueio) em cada compartimento da microplaca, promovendo a ligação da BSA aos locais deixados livres pelas moléculas do anticorpo. Incubou-se durante 1 hora a 37°C.

4.7.4 Ligação do antigénio

Procedeu-se, então, à aplicação de soluções contendo antigénio, proteína Phl p 5 e Ole e 1 ambas existentes nas amostras e nos padrões, que se ligam aos anticorpos imobilizados na fase sólida.

Na realização das curvas padrão recorreu-se a uma série de diluições sucessivas, obtendo-se concentrações correspondentes a 800; 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6, 25; 3, 125; 1,5625 ng/mL a partir de um padrão de Phl p5 purificado e 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78; 0,39; 0,2; 0,1 ng/mL de *Ole* e1 também purificado (2,5 µg/mL; Bial).

Foram igualmente preparadas uma gama de diluições (1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160) para as amostras e em cada ensaio foram analisadas pelo menos 3 diluições diferentes.

Na preparação dos padrões, amostras e controlos utilizou-se tampão de diluição (PBS-T suplementado com 1% de BSA). Foi também preparado um controlo negativo que consistiu em poços onde não foi adicionado o anticorpo de detecção e,

portanto, independentemente da presença ou não de antígeno, não deverá formar-se o produto da reação. Este passo permite averiguar a ocorrência de reações inespecíficas.

Adicionaram-se 100 µL das amostras, dos padrões e controlos positivos aos compartimentos da microplaca de acordo com a figura. No caso da análise da Ole e 1, as placas foram incubadas a 37 °C durante uma hora, enquanto no caso da análise do Phl p 5, estas permaneceram à temperatura ambiente durante 2 horas.

4.7.5 Adição do Anticorpo Secundário

A etapa de detecção consiste na adição de 100 µL de uma solução de anticorpo de detecção policlonal marcado com biotina, sendo para o Phl p 5 (12mL de tampão de diluição + 60µL7mL de biotina) e para a Ole e 1 (0,1x10⁻³ µg/mL de biotina + 12mL de tampão de diluição). As placas foram incubadas durante 1 h a a 37 °C ou à temperatura ambiente, consoante se tratasse da análise de Ole e 1 ou Phl p 5, respectivamente.

4.7.6 Adição do conjugado estreptavidina-peroxidase

Após a lavagem das placas, adicionou-se a cada compartimento da placa 100 µL de um conjugado contendo o conjugado que permitiu a detecção, POX (0,250 ng/mL) (Sigma). Nesta etapa, a incubação foi de 30 min para o Phl p 5 à temperatura ambiente e 1 h para a Ole e 1 a 37°C.

4.7.7 Adição do Substrato e Paragem da Reacção

As microplacas foram lavadas de modo a remover o excesso de enzima e posteriormente adicionaram-se 100 μ L do substrato Tetra-metilbenzidina (TMB) (Sigma) que após oxidação origina um produto corado de azul (fig.11 A). Aguardaram-se 10 minutos e parou-se a reacção com ácido sulfúrico (1,5M) (fig.11 B), verificando-se alteração da cor da solução de azul para amarelo. O produto da reacção foi quantificado por espectrometria de absorção molecular, determinando a absorvância a 450 nm.

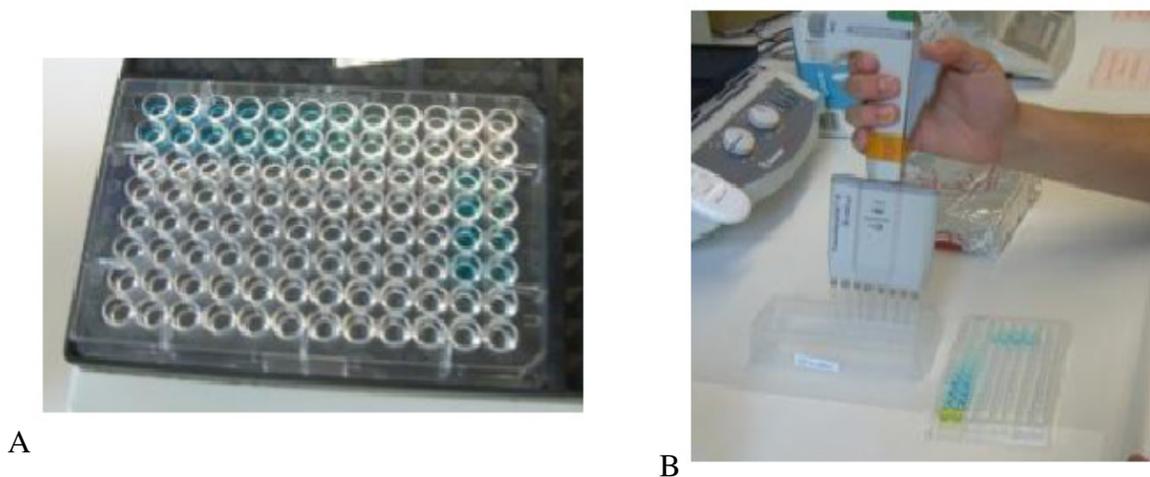


Figura 11. Obtenção do produto a reacção, após a adição de TMB e paragem da reacção (retirado de Ferro, 2010).

4.7.8. Captação e Quantificação dos Aeroalergénios Phl p 5 e Ole e 1 na cidade de Évora

Este tipo de ensaio foi o escolhido por permitir, além da análise de extractos totais, amostras impuras, tendo sido anteriormente utilizado por outros autores para quantificação de outras proteínas alergénicas (Buters et al., 2010; Ferro, 2010). No

entanto, ambos os alergénios se mostraram muito reprodutíveis e sensíveis ao método de Elisa *sandwich*.

Em cada ensaio foi sempre preparada uma curva de calibração (fig.12) utilizando soluções padrão de Phl p 5 e Ole e 1 purificado. A figura mostra um exemplo de curva de calibração típica das que foram realizadas em laboratório e em que os pontos experimentais foram ajustados a uma sigmóide log-logística utilizada posteriormente para a determinação da concentração das amostras.

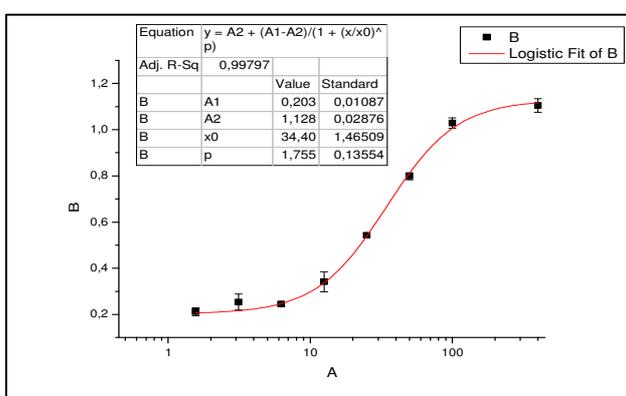


Figura 12. Aspecto de uma curva de Calibração sigmóide log-logística utilizando soluções padrão.

Todas as curvas sigmóides foram similares tendo a absorvância variado entre 0,1 e 1,8 para o Phl p 5 e 0,1 e 3,0 para a Ole e 1, utilizando soluções padrão cujas concentrações variaram no intervalo e 0,1 ng/mL a 50 ng/mL para a Ole e 1. Os limites mínimos e máximos de sensibilidade para quantificação do Phl p 5 foi de 1,5625 ng/mL e 800 ng/mL e para a Ole e 1 foram de aproximadamente 1 ng/mL a 25 ng/mL. A equação da curva sigmóide logística é então:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2$$

Onde:

y – absorvância;

A₁ – absorvância mínima curva;

A₂ – absorvância máxima da curva;

x – Concentração de alérgénio a determinar;

x₀ – Concentração de alérgénio correspondente ao ponto médio da curva (ponto de inflexão);

p – declive.

Através desta equação conseguiu-se determinar por interpolação os valores que se encontram nos intervalos de absorvância correspondentes à zona de maior declive da curva, ou seja, de maior sensibilidade pois acima ou abaixo destes limites o método é menos sensível.

Para avaliar a reprodutibilidade e exactidão do método foram ainda utilizados controlos positivos com concentração conhecida e que se situam no intervalo de sensibilidade da curva de calibração.

4.7.9. Determinação da quantidade de alérgénio por m³ de ar

A determinação das concentrações de Phl p 5 e Ole e 1 fez-se por interpolação da curva sigmóide ajustada aos pontos da curva construída com os padrões de cada um purificado, multiplicando-se pelo factor de diluição com o qual a amostra foi preparada. Dado que a concentração obtida a partir desta se refere ao aeroalérgénio existente num poço da microplaca de ELISA (100 µL), torna-se necessário convertê-la para a quantidade total de alérgénio extraído dos filtros do CHEMVOL-Sampler utilizando-se a equação:

$$[\text{Alérgénio}](\text{pg/mL}) = \frac{[\text{Alérgénio}](\text{ng/mL})}{\frac{f_d \times V_e \times 3}{1,155}}$$

Onde:

f_d – Factor de diluição = 10;

V_e – Volume de tampão de extracção = 15 mL para os filtros XL ou 6 mL para os filtros

M;

3 – Número de partes num filtro;

1,155 – Volume de ar que passa no filtro (m³).

Os resultados apresentados estão expressados em picogramas por metro cúbico de ar capturado pelo colector (pg/m³).

4.8. Caracterização da população em estudo e determinação da sua sensibilização

Neste trabalho procurou-se também estudar a sensibilização a proteínas das espécies *Phleum pratense* e *Olea europea* em pacientes que frequentam as consultas externas de imunoalergologia de Hospitais do distrito de Évora, regiões onde a concentração de gramíneas e a plantação de oliveira são bastante elevadas. Para isso foram realizados testes cutâneos de Prick modificado ao *Phleum* total e *Olea* total e especificamente ao Phl p 5 e Ole e 1.

A amostra conseguida foi de apenas de 67 pacientes, todos polissensibilizados, 36 são do sexo feminino e 31 do sexo masculino, dos quais apenas 9 se conseguiram obter a informação completa. Os dados que se seguem são correspondentes aos **67 pacientes**. A média de idades é de **38±3 anos para as mulheres** e **32± 3 anos para os homens**, não sendo a diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

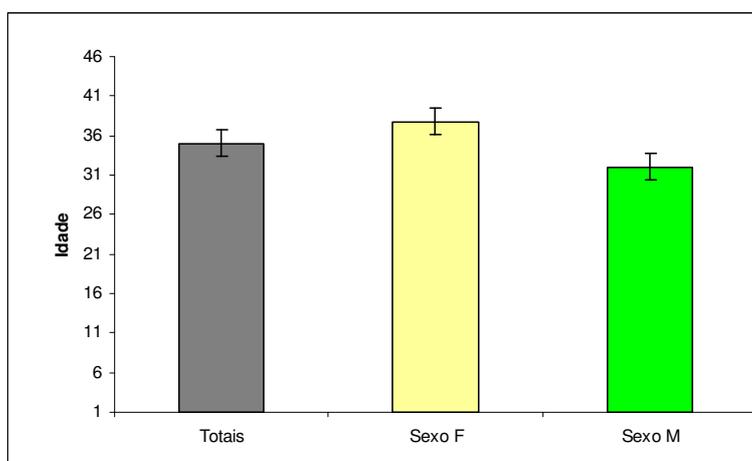


Figura 13. Idade média dos pacientes da população em estudo de acordo com o género (Masculino e Feminino). As barras representam o valor médio±3 epm ($p > 0,05$).

Dos pacientes diagnosticados escolheram-se aqueles que apresentaram sensibilização ao *Phleum*, à *Olea* ou aos dois.

4.9. Recolha e análise da sintomatologia e sua correlação com os parâmetros ambientais medidos

4.9.1. Registo dos sintomas dos pacientes

Procedeu-se ao registo sistemático dos sintomas do grupo de pacientes em estudo, trabalho que foi realizado sob coordenação da Dra. Luísa Lopes. Solicitou-se aos pacientes que em cada dia do mês, registassem os sintomas e os classificassem de acordo com a sua intensidade dos sintomas de 0 a 3, em que 0 corresponde à ausência e 3 à intensidade máxima de sintomas, no período de 5 de Abril de 2011 a 30 de Junho de 2011. Na lista incluíram-se 9 sintomas distintos: espirros, rinorreia, obstrução nasal, pruido nasal, lacrimejo, pruido ocular, olhos inflamados, pestanas coladas e respiração ruidosa (fig.14). A pontuação máxima possível correspondeu a 27. Tendo em conta a pontuação máxima possível e a registada diariamente determinou-se a percentagem de intensidade dos sintomas e procurou-se averiguar a correlação entre este parâmetro e os dados polínicos (obtidos pelo método Hirst) e dos alérgenos (quantificados por ELISA).

Registo diário de sintomas de medicação em doentes alérgicos

Ficha nº: _____ Sexo: _____ Data de nascimento: _____
Nome: _____ Morada: _____
Diagnóstico: _____ Estudo alergológico: _____

Ano: _____
Mês: _____

Sintomas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
Espirros																																
Rinorreia																																
Ostrução nasal																																
Prurido nasal																																
Lacrimação																																
Prurido ocular																																
Olhos inflamados																																
Pestanas coladas																																
Respiração ruidosa																																

Classificação de sintomas:
0 Ausente
1 Ligeiro
2 Moderado
3 Intenso

Por favor não se esqueça de preencher este impresso todos os dias. Não deixe ficar para o fim de semana; a memória pode falhar, há erros cometem por esquecimento, diminuído a precisão necessária.

Figura 14. Réplica do questionário que foi entregue aos pacientes

4.9.2. Análise da correlação entre os sintomas dos pacientes e os doseamentos atmosféricos de pólen e aeroalergénios

Devido ao facto da polinização ocorrer em picos e não de forma contínua ou constante analisou-se o perfil das curvas (sintomas dos pacientes; grãos de pólen; aeroalergénios) onde se observaram oscilações nas curvas, podendo estas subdividir-se em vários picos ao longo da estação polínica. Assim, tomaram-se os diversos picos e procurou-se averiguar se estes se correlacionavam com a quantidade média de alergénio ou o pólen, durante o mesmo período.

Para a avaliação do significado estatístico os valores dos grupos foram submetidos a vários parâmetros nomeadamente média, desvio-padrão, erro padrão da média, bem como o teste de análise de variância segundo o método ANOVA para um nível de significância de 0,05. Por ultimo, foi utilizado o teste não-paramétrico de Spearman para avaliar se havia correlação entre os valores obtidos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Conteúdo em pólen de *Poaceae* e *Olea* e alergénios Phl p 5 e Ole e 1 no ar exterior da cidade de Évora em 2011

Neste estudo procurou-se determinar o conteúdo em alergénios que se crêem mais relevantes do ponto de vista alergológico no Alentejo, Phl p 5 e Ole e 1, em amostras de ar exterior colhidas na cidade de Évora e estudar a sua correlação como conteúdo polínico atmosférico.

A figura 15 mostra a distribuição dos alergénios ao longo da estação polínica de 2011 encontrada nos filtros M e XL, correspondentes às fracções de suspensão de ar de partículas de dimensões $2,5\mu\text{m} < \text{PM} < 10\mu\text{m}$ e $\text{PM} > 10\mu\text{m}$, respectivamente. Os gráficos mostram a existência de proporcionalidade entre a proporção de alergénio recolhida nos filtros XL e M, independentemente de se tratar de Phl p 5 ou Ole e 1 (Fig. 15A e 15B). Observou-se ainda que as proteínas Phl p 5 e Ole e 1 ficaram maioritariamente retidas nos filtros XL, correspondendo a cerca 90% do total (Fig. 15A e 15B, “inlet”).

Em 2011, o perfil em alergénio Phl p 5 iniciou-se em 5 de Abril de 2011 e teve a duração de 100 dias e caracterizou-se pela presença de dois picos de elevada concentração entre 5 e 27 de Maio (Fig. 15A). O Valor máximo de Phl p 5 registou-se no dia 22 de Maio atingindo **3041** pg/m^3 de ar (valor médio das 24h). No que respeita ao alergénio Ole e 1, a época estendeu-se de 5 de Abril de 2012 a 13 de Julho de 2012 e caracterizou-se por um pico que ocorreu entre os dias 26 de Abril e 17 de Maio (Fig. 15B). O valor mais elevado registado foi de **2202** pg/m^3 de ar e ocorreu no dia 11 de Maio.

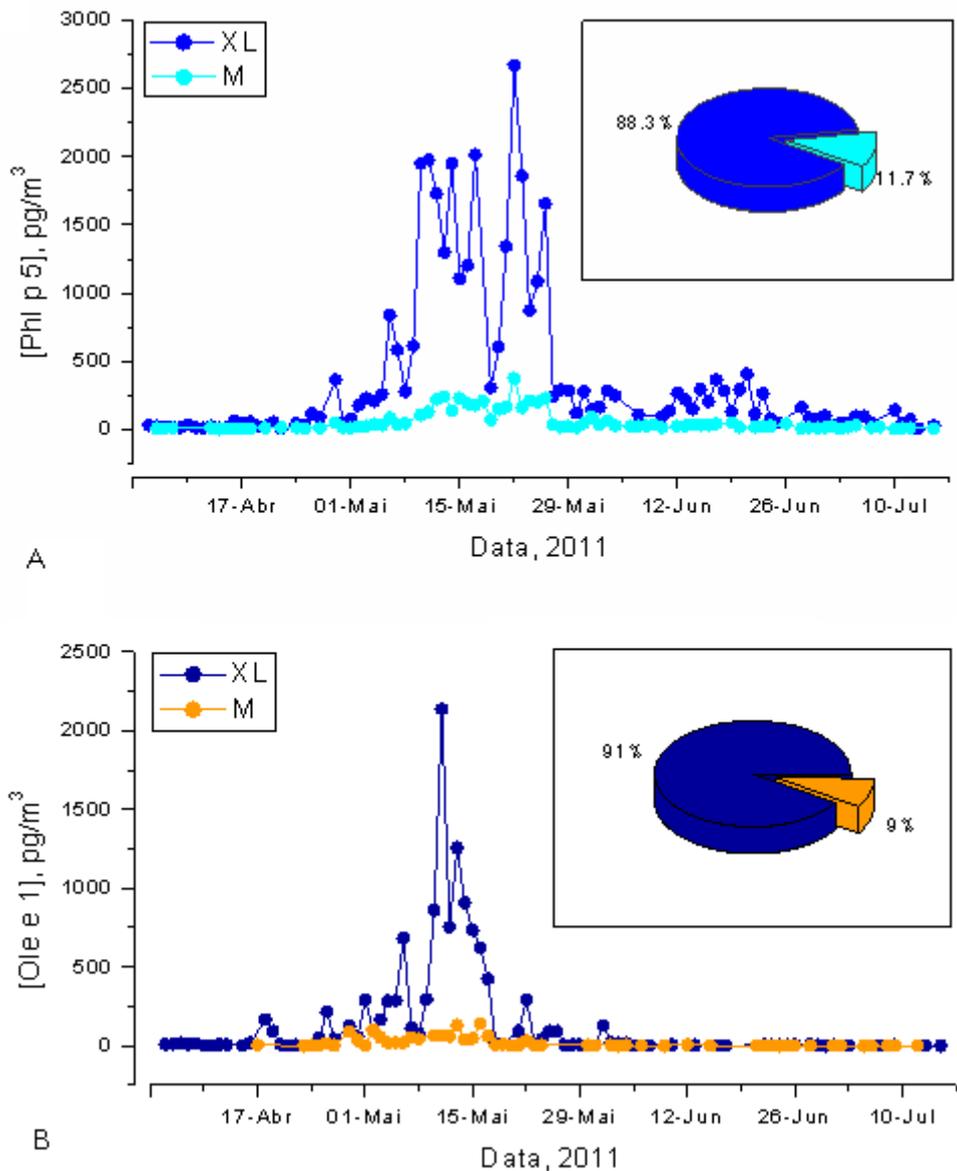


Figura 15. Distribuição de alergénio nas fracções PM $>$ 10 μ m (XL) e 2,5 $>$ PM $>$ 10 μ m (M) durante a estação polínica de 2011. (A) Variação diária da concentração de *Phl p 5* e percentagem de distribuição (“inlet”); (B) Variação diária da concentração de *Ole e 1* e percentagem de distribuição (“inlet”).

Por outro lado, analisando o perfil de distribuição de alergénios e comparando-o com o perfil das curvas polínicas observou-se um elevado grau de sobreposição entre os dois parâmetros (Fig. 16 e Fig. 17). De facto, no caso das gramíneas, o pico de alergénio *Phl p 5* (3041 pg/m³) observou-se no mesmo dia em que se registou o número mais elevado de grãos de pólen de toda a estação com **1676** pólen/m³ de ar

(fig 16). Para além disso, observou-se uma correlação positiva ($r^2=0,56$) entre a quantidade de Phl p 5 e pólen de gramíneas no ar (Fig. 16, “inlet”).

No que respeita ao perfil em alergénio Ole e 1, este caracterizou-se por uma fase mais concentrada de polinização entre os dias 26 de Abril e 17 de Maio, registando-se vários picos em que as concentrações polínicas são superiores a 800 grãos/ m^3 , incluído o pico mais elevado de alergénio Ole e 1 (2202 pg/m^3). No entanto, também se observou uma correlação positiva ($r^2=0,49$) entre a quantidade de Ole e 1 e pólen de Oleaceae no ar (Fig. 16, “inlet”).

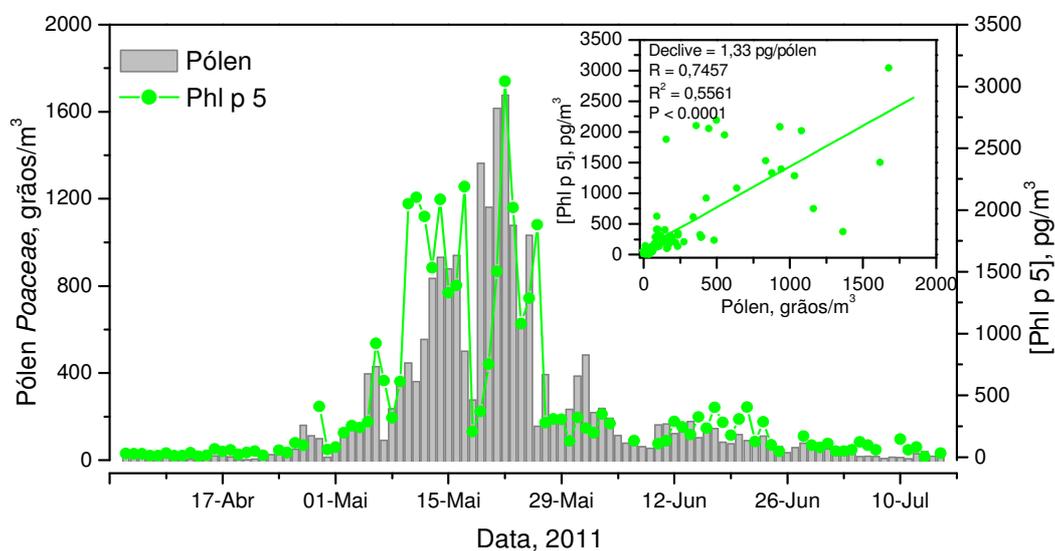


Figura 16. Perfil da curva polínica de *Poaceae* e conteúdo do aeroalergénio Phl p 5 presente no ar atmosférico exterior nas estações polínicas de 2011.

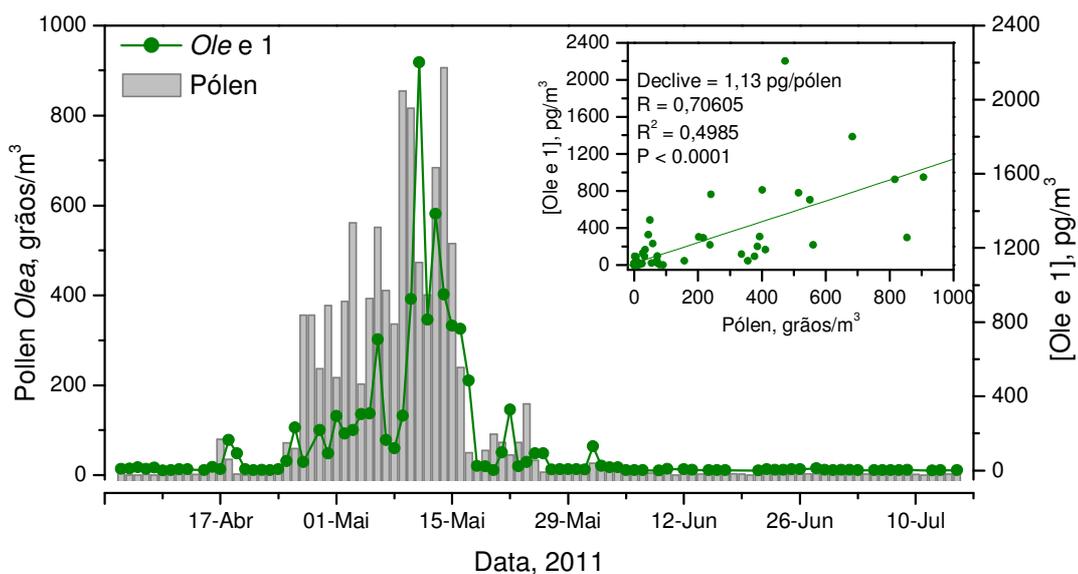


Figura 17. Perfil da curva polínica de *Olea europaea* e conteúdo do aeroalergénio *Ole e 1* presente no ar atmosférico exterior na estação polínica de 2011.

Finalmente, em 2011 a quantidade total de alergénio Phl p 5 no ar foi de **38977** pg/m³ e o valor total de grãos de pólen das gramíneas foi de **14607** grão/m³ (Fig. 18A). No caso do alergénio *Ole e 1* registou-se o valor de **12958** pg/m³ e as contagens de pólen de oliveira tomou o valor de **6295** grão/m³ nesta estação polínica (Fig.18B). Tomando os valores totais da estação polínica, a quantidade de alergénio libertada por grão de pólen foi de 1,33pg/pólen e de 1,13 pg/pólen para as gramíneas e a oliveira, respectivamente (Fig. 16 e 17, “inlets”).

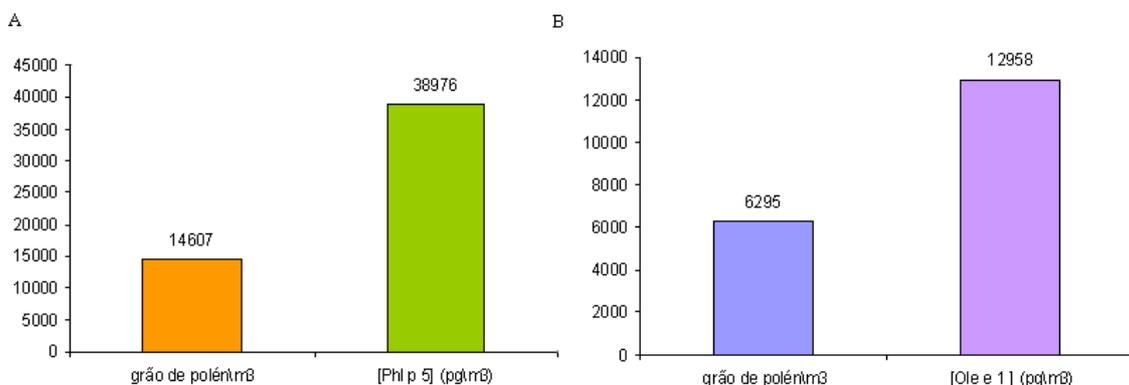


Figura 18. Concentração de grãos de pólen e concentração de Phl p5 (A) e *Ole e1* (B) ao longo da época de 2011

Comparando os resultados com os dos anos anteriores observou-se que 2011 foi um ano médio em termos de pólen de gramíneas. O conteúdo em Phl p 5 foi de 38976 pg/m³, valor esse, mais elevado que nos anos anteriores. No entanto, a carga alergénica do pólen de gramíneas em 2011 atingiu o valor mais baixo (1,33pg/pólen) registado nos últimos três anos (Lopes et al., 2011; Ferro et al., 2011).

No que concerne à Ole e 1 observou-se que em 2011 o número de grãos de pólen diminuiu para metade (6295 grão/m³) em relação a 2010 (12594 grão/m³), contudo observou-se uma diminuição na carga alergénica por grão de pólen entre 2,678pg/m³ e 1,13 pg/m³ (Lopes et al., 2011;Ferro et al., 2011) o que nos possibilita dizer que no ano 2010 obteve-se uma carga alergénica maior.

À semelhança do que fora observado em anos anteriores observou-se que os alergénios ficaram maioritariamente retidos nos filtros XL, que retêm partículas de dimensões superiores a 10µm, compatíveis com as dimensões dos grãos de pólen (Lopes et al, 2011; Ferro et al, 2011). Por outro lado, observou-se ainda uma elevada correlação entre as quantidades de alergénio e de pólen no ar (Fig. 17 e 18) facto já observado noutros estudos (Lopes et al., 2011; Ferro, 2011). Em conjunto, estes resultados sugerem que os alergénios são maioritariamente transportados pelos grãos de pólen. Uma pequena fracção dos alergénios foi, no entanto, registada nos filtros M, onde ficam retidas partículas cujas dimensões variam de 2,5 a 10µm, não permitindo excluir a possibilidade do alergénio também poder existir no ar associado a outro tipo partículas que não os grãos de pólen, como foi já sugerido na literatura (D'Amato, 2007; Adhikari et al., 2006).

5.2. Determinação da sensibilização da população em estudo

A figura 19 A. mostra a prevalência da sensibilização da população em estudo. Observou-se que 72 % dos pacientes apresentam sensibilização ao *Phleum* total e 48% à *Olea* total, não se tendo observado diferenças significativas entre géneros. No entanto, observa-se que os pacientes apresentaram maior sensibilização ao Phl p 1 do que ao Phl p 5, sendo a prevalência de 73% e 48%, respectivamente. No caso da *Olea*, observou-se que a reactividade a *Olea* total foi significativamente maior que a Ole e 1. Cerca de 1% dos pacientes reagiram apenas a Ole e 1 (Fig. 19 C).

A figura 19 B. mostra que 42% dos pacientes, independentemente do género, apresentaram sensibilização ao *Phleum* total, Phl p1 e Phl p5. Só 3% dos pacientes e todos do género masculino manifestaram sensibilização somente a Phl p 5.

No caso da *Olea* (Fig. 19 C), os resultados mostram que 16% dos pacientes apresentaram sensibilização a *Olea* total, Ole e 1 e Ole e 2 sendo mais prevalente entre o género feminino. Observou-se, ainda, novamente, que uma pequena percentagem (1%), todos do género masculino, apresentou sensibilização, à Ole e 1.

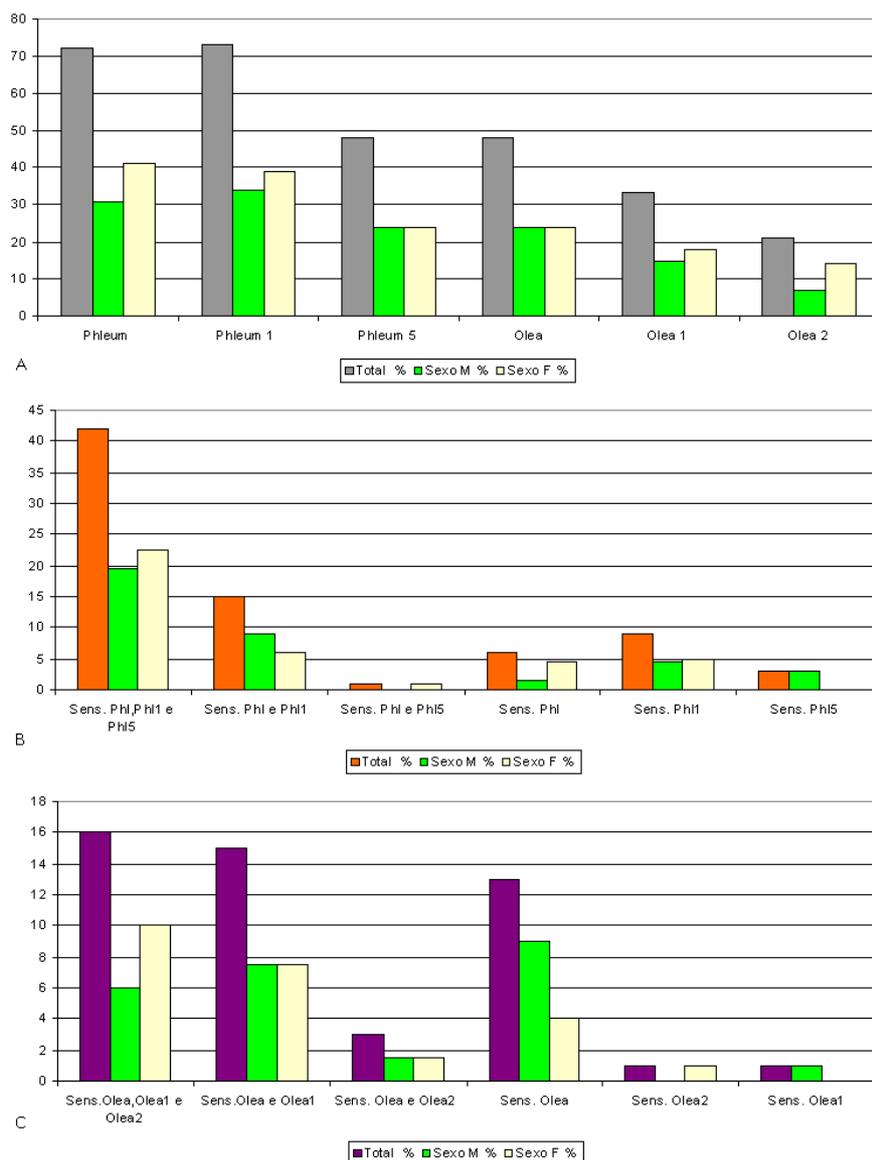


Figura 19. Prevalência da sensibilização a proteínas de *Phleum* e *Olea* na população em estudo. (A). Total de Pacientes sensíveis quer á *Olea* total, Ole e 1, Ole e 2 quer ao *Phleum* total, Phl p 5, Phl p 1. (B) Pacientes que apresentam sensibilidade *Phleum* total, Phlp 5, Phl p1. (C) Pacientes que apresentam sensibilidade *Olea* total, Ole e 1, Ole e 2 (Anexo 1).

Em suma, a prevalência da sensibilização na população estudada, que se considera representativa da população no distrito de Évora, foi de 48% para o Phl p 5 e de 33% o Ole e 1 entre os mais relevantes. Observou-se ainda que uma percentagem dos indivíduos reagiu a alergénios específicos sem apresentar reactividade ao extracto total. É conhecido que o elevado grau de semelhança estrutural entre alergénios de diversas espécies determina a existência de extensa reactividade cruzada entre as proteínas alergénicas do pólen de outras espécies pertencentes à família *Oleaceae* e

também com pólenes não relacionados filogeneticamente como as gramíneas (Taketomi et al, 2006).

Esta reactividade cruzada contribui provavelmente, a par da variação geográfica e anual do conteúdo em alergénio do pólen, para os desvios observados na correlação entre os sintomas dos pacientes e a quantidade de pólen no ar. Estes factores determinam em grande parte os impactos do pólen na saúde pública, sendo, portanto relevante o esclarecimento da relação entre os sintomas e os alergénios “major” mais representativos na região, no caso particular deste estudo Phl p 5 e Ole e 1, tendo em consideração o tipo e grau de sensibilização dos pacientes estudados.

5.3. Análise da prevalência dos sintomas e estudo da sua correlação com os conteúdos polínicos ou de aeroalergénios

Apenas 9 pacientes entregaram na consulta de imunoalergologia os questionários com a informação completa dos sintomas ao longo da época polínica (de Abril até Junho). Todos são polissensibilizados, apresentando sensibilização a pelo menos um dos alergénios em estudo. As idades estão compreendidas entre os 14 e os 49 anos.

Os resultados de prevalência de sintomas estão resumidos na figura 20. Observou-se que o sintoma manifestado com maior intensidade foi a obstrução nasal (19%) seguido do prurido nasal (16%) e o sintoma menos relevante foi o das pestanas coladas (2%).

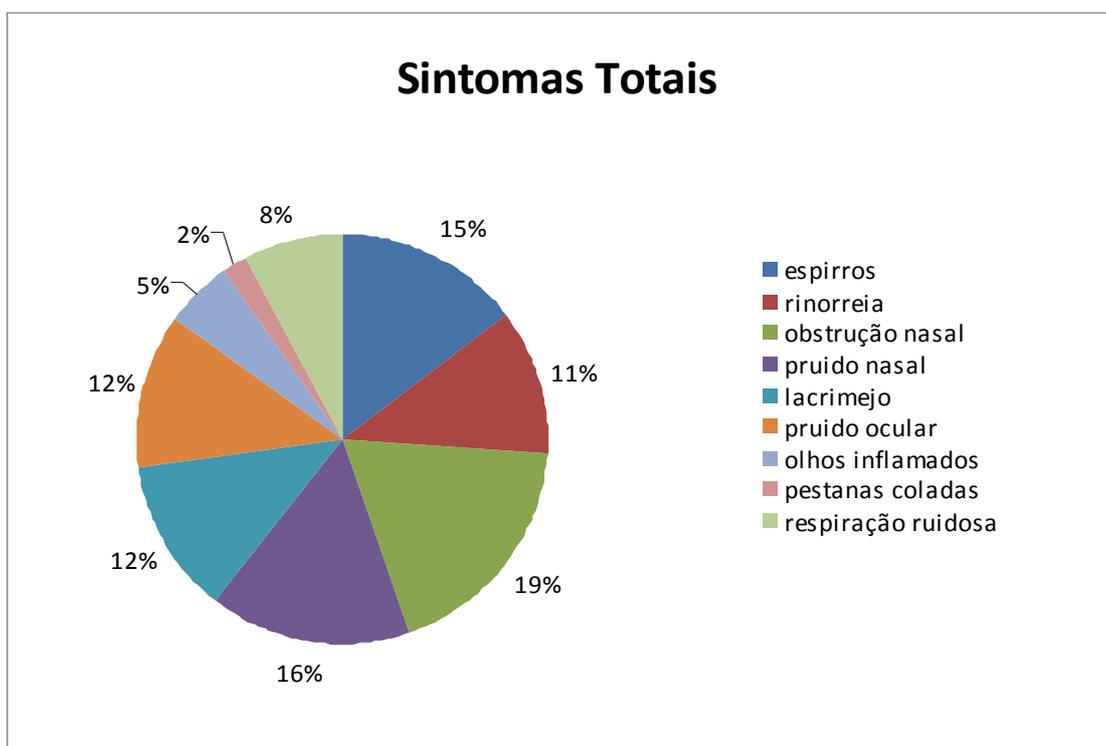


Figura 20. Prevalência dos sintomas dos pacientes ao longo da época polínica (Abril até Junho de 2011)

Utilizando os resultados obtidos nos questionários foi possível traçar a curva de evolução da intensidade dos sintomas diários dos pacientes ao longo da estação polínica e procurou-se avaliar a correlação desta com as curvas polínicas e de aeroalergénios em 2011 (Fig. 21 a 23). A figura 21 mostra a sobreposição dos sintomas com a curva de polinização das gramíneas (A) e com a curva de polinização de aeroalergénio Phl p 5 (B). Observando as figura 21. A e B, parece existir uma correlação entre os picos dos sintomas com o número de grão de pólen/ m^3 de ar bem como com a concentração de Phl p 5 durante a época polínica das gramíneas, em particular no final da estação polínica.

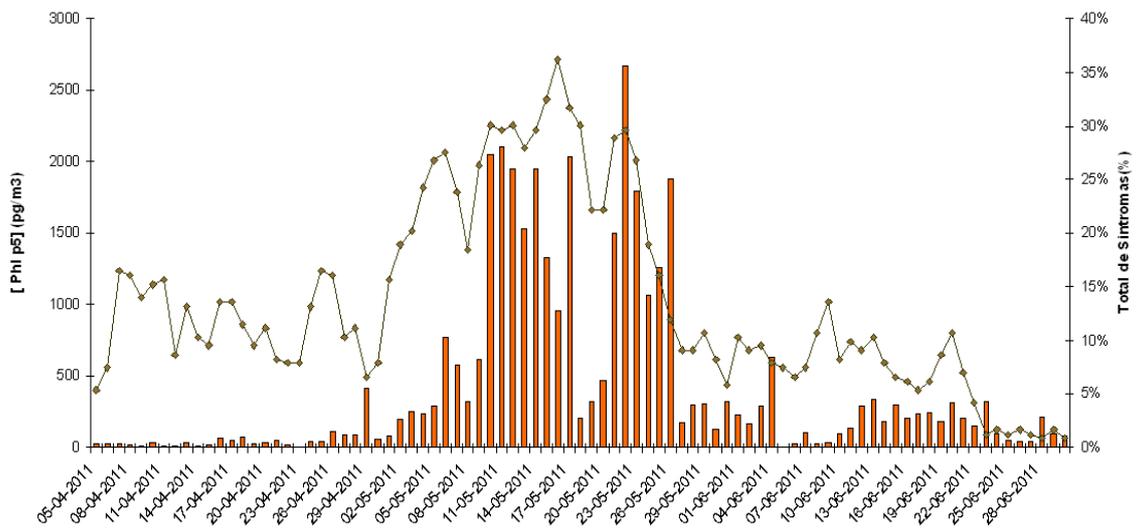
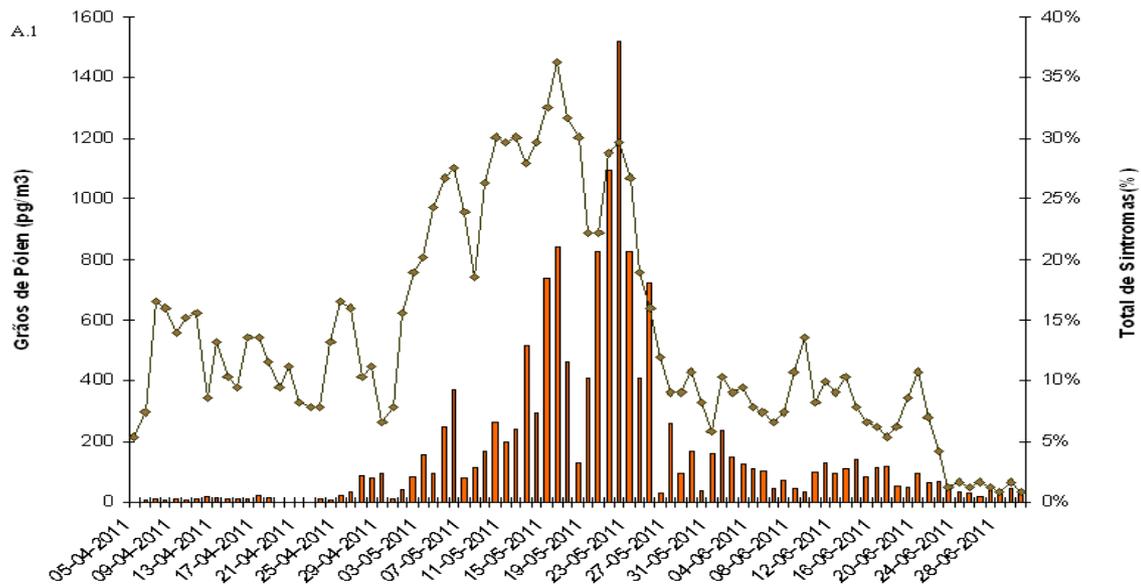


Figura 21. Correlação dos sintomas com as concentrações polínicas (A) e de aeroalergénio de *Phl p5* (B)

Na figura 22 mostram-se os resultados obtidos para a *Olea*. Pode observar-se que também neste caso parece existir uma correlação entre a intensidade dos sintomas e a curva polínica (A) e de *Ole e 1* (B), particularente no início da estação polínica.

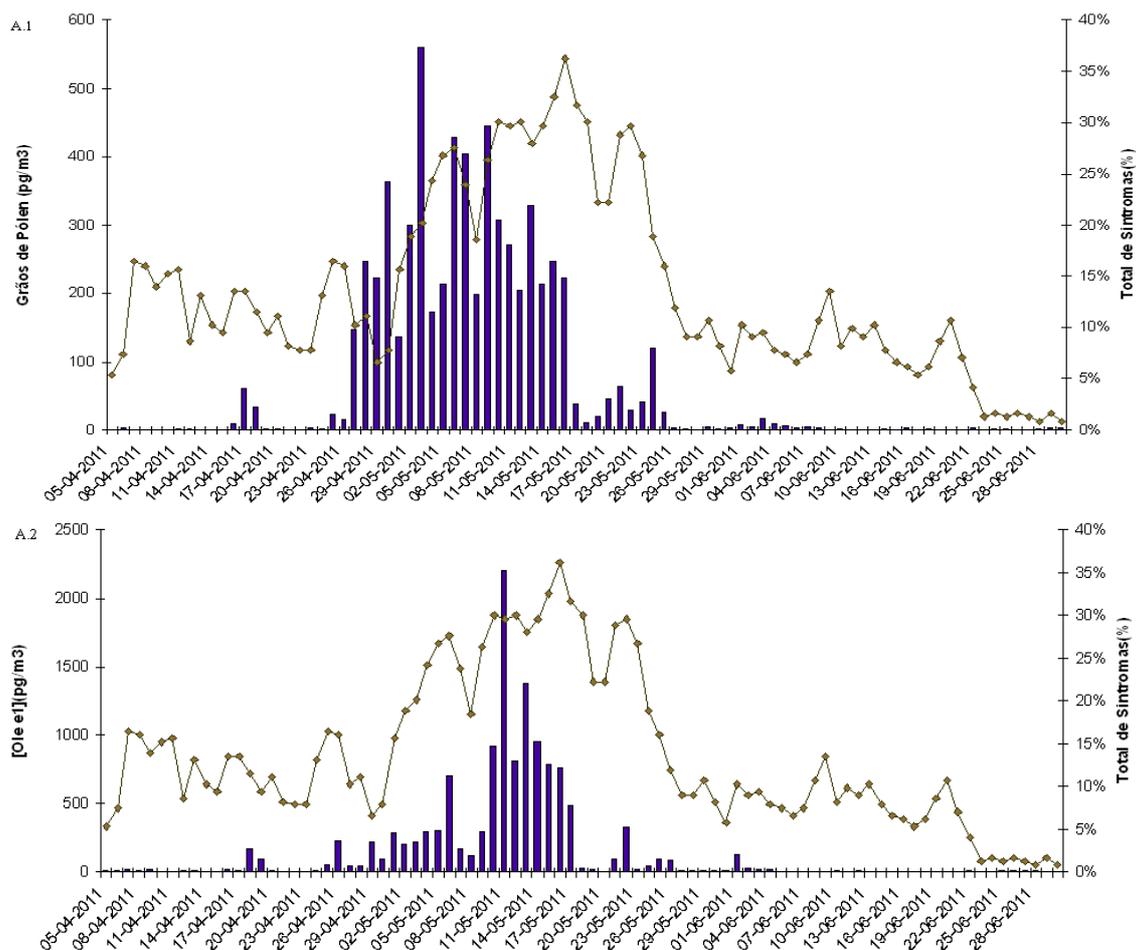


Figura 22. Correlação dos sintomas com as concentrações polínicas (A.1) e de aeroalergénio de Ole e 1 (A.2)

Os resultados das figuras 21 e 22 mostram alguns desvios da curva de sintomas relativamente quer ao pólen quer ao alergénio, no início da estação para as gramíneas e no fim da estação para a oliveira. As figuras mostram ainda que a polinização da oliveira se iniciou mais cedo que a das gramíneas. Por seu turno, esta última estendeu-se até mais tarde. Por outro lado, é aparente que o período de maior intensidade dos sintomas correspondeu às semanas em que ocorreu sobreposição da polinização de *Poaceae* e *Olea*. Tendo em consideração que os pacientes eram polissensibilizados, os resultados sugerem que a intensidade dos sintomas poderá resultar da presença de ambos os tipos polínicos / alergénios.

A figura 23 mostra a correlação da curva dos sintomas com o somatório dos pólenes de *Poaceae* e *Olea* (A) e de alergénios Ole e 1 e Phl p 5 (B). A figura sugere

uma correlação entre as variáveis medidas durante toda a estação polínica, mostrando sobreposição das curvas no período de 29 de Abril até 26 de Maio de 2011.

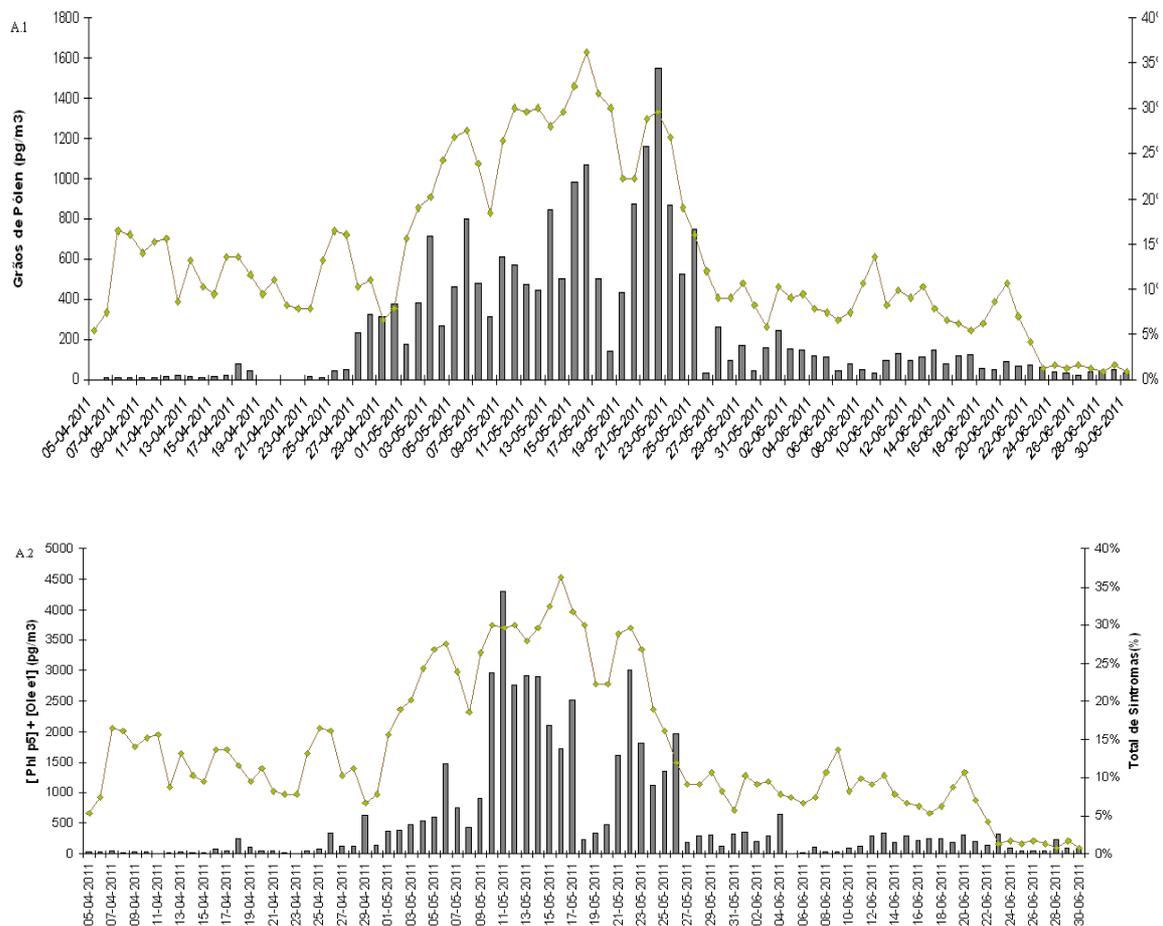


Figura 23. Correlação dos sintomas com as concentrações polínicas (A1) e dos aeroalergénios de Phi p 5 + Ole e 1 (A2).

No entanto, em qualquer dos casos anteriormente apresentados, estes resultados não são estatisticamente significativos devido à pequena dimensão da amostra. Analisando as diferentes curvas pode observar-se que quer o conteúdo polínico quer o de alérgenos no ar apresentam vários picos. Procurou-se então dividir os dados de acordo com os picos identificados, agrupando os sintomas registados para o mesmo grupo de dias. Tomaram-se os diversos picos e procurou-se averiguar se os sintomas se correlacionam com a quantidade média de alérgeno ou o pólen, durante o mesmo período. Os resultados desta análise estão resumidos na figura 24.

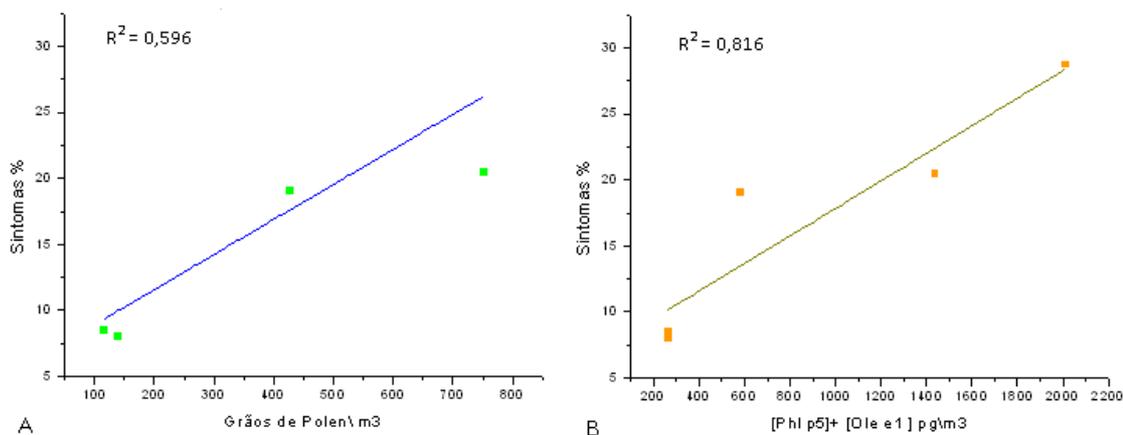


Figura 24. Correlação entre a intensidade relativa dos sintomas e as contagens polínicas (A) ($p > 0,05$) e os aeroalergénios (B) ($p < 0,05$) (Anexo 2) .

Pela análise de correlação observa-se que o respectivo coeficiente é mais baixo ($r^2=0,596$) para os grãos de pólen do que para a relação entre sintomas e os aeroalergénios ($r^2=0,816$) o que indica a existência de uma maior associação ($p < 0,05$) entre os sintomas e os aeroalergénios. Ao nível da correlação não-paramétrica de Spearman a única coisa que se pode afirmar é que ambas as variáveis variam no mesmo sentido (Anexo 3).

Nos resultados aqui mostrados observa-se que a intensidade dos sintomas se correlaciona melhor com o nível de aeroalergénios do que com os níveis polínicos. Estes resultados vão de encontro ao que seria de esperar, na medida em que os aeroalergénios são os responsáveis pelo desencadear da resposta alérgica e não o grão de pólen (Behrendt et al., 2001). Por outro lado, as contagens polínicas, embora sejam um indicador do nível de alergénios na medida em que estes são transportados essencialmente pelo pólen, nem sempre representam o conteúdo de aeroalergénios no ar (Buters et al., 2001). Estes resultados estão também de acordo com outros resultados na literatura (Feo-Brito et al, 2010a) e 2010b)) e reforçam a importância da determinação da carga alérgica do ar enquanto indicador mais adequado para a determinação da exposição a aeroalergénios e, por isso, parâmetro mais adequado para a previsão do risco de desenvolvimento de sintomatologia alérgica.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível avaliar a distribuição de pólen e alergénios no ar exterior, mostrar a existência de correlação entre eles e ainda avaliar, ainda que de forma preliminar, a correlação entre estes parâmetros e a intensidade de sintomas observados em pacientes alérgicos sensibilizados às espécies estudadas.

Em conclusão, observou-se que:

- 1) À semelhança de anos anteriores, os resultados da época polínica 2011 mostram que cerca de 90% dos aeroalergénios Phl p 5 e Ole e 1 se encontra maioritariamente na fracção de partículas cuja dimensão é superior a 10µm;
- 2) O perfil do conteúdo em aeroalergénios seguiu o perfil de distribuição polínica, existindo uma correlação positiva entre os dois parâmetros (figura 15; figura 16);
- 3) Em conjunto, estes resultados indicam que estão maioritariamente associados aos grãos de pólen;
- 4) A prevalência de sensibilização a *Phleum* total foi de 72% e em 48% dos casos os indivíduos eram também sensíveis a Phl p 5;
- 5) 48% dos pacientes apresentaram sensibilização a *Olea* total e 33% a Ole e 1;
- 6) O sintoma que se manifestou com maior intensidade ao longo da época polínica foi a obstrução nasal, seguida do prurido nasal;
- 7) Maio foi o mês em que os indivíduos apresentaram maior sensibilidade às espécies estudadas;
- 8) Os resultados apontam para uma correlação positiva entre sintomas e conteúdo polínico e alergénios.

Este trabalho poderá contribuir para o desenvolvimento de um indicador que permita melhorar a previsão do risco de exposição a aeroalergénios, baseado na monitorização destes últimos, a par da monitorização do conteúdo polínico em ar exterior e assim contribuir para a melhoria da prevenção e, conseqüentemente, da prevenção.

7. CONSIDERAÇÕES PARA O FUTURO

Na análise aerobiológica estudada, que tem como objectivo prevenir o risco de patologias alérgico-respiratórias, acredita-se que seria benéfico e importante no complemento do trabalho aqui apresentado, serem considerados os seguintes aspectos:

- A amostra populacional deve alojar o maior número de pacientes possível, de forma a ter significado estatístico;
- Quantificar os alérgenos em amostras de ar atmosférico durante as épocas polínicas dos próximos anos;
- O conhecimento fornecido pela monitorização aerobiológica pode ajudar na selecção de alérgenos no procedimento do diagnóstico do doente alérgico;
- Verificar a existência de correlação entre a quantidade de alérgenos e as contagens polínicas obtidas pela metodologia certificada actualmente vigente assente em tecnologias volumétricas de tipo Hirst das próximas épocas polínicas;
- Continuar a estudar a influência de variáveis ambientais, como a humidade relativa, temperatura, exposição solar, na produção de alérgeno no grão de pólen;
- Deslindar a potência alérgica dos extractos de pólen utilizando linhas celulares;
- Seria também interessante adoptar procedimentos de extracção que nos permitam modelar a forma de libertação dos alérgenos, ajudando a compreender a sua acção.

8. BIBLIOGRAFIA

A

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Cellular and molecular immunology. 5 ed. Philadelphia, Usa: Saunders, p.562, 2003.

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. Cellular and molecular immunology. 6 ed. Philadelphia, Usa: Saunders, p.562, 2008.

Anderson, K.; Lidholm, J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. International Archives of allergy and Immunology, p. 87-107, 2003.

Arlan, L.G. Arthropod allergens and human health. Annual Review of Entomology, p. 395-433, 2002.

Arilla, M. C.; Ibarrola, I.; Eraso, E.; Aguirre, M.; Martinez, A.; Asturias, J. A. Quantification in mass units of group 1 grass allergens by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. Clinical and Experimental Allergy, p. 1271-1278, 2001.

Atin Adhikari, Tiina Reponen, Sergey A Grinshpun, Dainius Martuzevicius, Grace LeMasters, Correlation of ambient inhalable bioaerosols with particulate matter and ozone: A two-year study Environmental Pollution v.140, p. 16-28, 2006.

B

Bass, D. J.; Delpech, V.; Beard, J.; Bass, P.; Walls, R.S. Late summer and fall (March-May) pollen allergy and respiratory disease in Northern New South Wales, Australia. Annals of Allergy and Asthma Immunology, p.347-381, 2000.

Behrendt, H.; Becker, W. M. Localization, release and bioavailability of pollen allergens, the influence of environmental factors. *Current Opinion in Immunology*, p. 709-715, 2001.

Brandão R.; Sampling Techniques for Bioaerosols. Summer Course 2004 Aerobiology and Environment, Madeira, Funchal, Abstracts Book 2004.

Brandão RM e Lopes ML. O Ambiente Aeropalinológico e as Alergias Respiratórias na Região de Évora. Actas da II Conferência Nacional da Qualidade do Ambiente, Lisboa. 1990.

Brandão RM, Lopes ML e Caeiro E A Rede Portuguesa de Aerobiologia. 8ª Conferência Nacional de Ambiente, Centro Cultural de Belem 27-29 Outubro 2004.

Buters, J. T. M., Weichenmeier, I., Ochs, S., Pusch, G., Kreyling, W., Boere, A. J. F., Schober, W., H. Behrendt; The allergen Bet v 1 in fractions of ambient air deviates from birch pollen counts. *Allergy; Biotechnology and in vitro Diagnostics*, 2010.

Burbach, G. J., Heinzerling, L. M., Röhnelt, C., Bergmann, K.-C., Behrendt, H. and Zuberbier, T., Ragweed sensitization in Europe – GA²LEN study suggests increasing prevalence. *Allergy*, v.64, p.664–665, 2009.

C

Caeiro, E. R. G., Estudo Aeropalinológico Comparativo da Atmosfera de Évora e Portimão. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal. Área de especialização em Biologia Vegetal (Botânica), Universidade de Coimbra, 2004.

Caeiro E., Brandão R., Carmo S., Lopes L., Almeida M. M., Gaspar A., Oliveira J. F., Todo-Bom A., Leitão T., Nunes C.; The Portuguese Aerobiology Network: Airborne pollen results (2002-2006), *Rev. Port. Imunoalergologia* ; v15 p. 235 - 250, 2007.

Camacho I. G. C. ; Estudo aerobiológico da cidade do Funchal: detecção bioquímica dos principais aeroalergénios polínicos. Tese de Doutoramento, Universidade da Madeira, 2007.

Castro, A.J., Bednarczyk, A., Schaeffer-Reiss, C.,Rodríguez-García, M. I., Van Dorselaer, A., Alché, J. D.; Screening of Ole e 1 polymorphism among olive cultivars by peptide mapping and N-glycopeptide analysis; *Proteomics*; vol.10, p.953–962, 2009.

Chapman, M. D.; Smith, A. M.; Vailes, L. D.; Arruda, K.; Dhanaraj; V.; Pomés, A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, p.409-418, 2000.

Corry, D. B.; Kheradmand, F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature*, London, v. 402, p. B18-23, 1999.

Cruz, M. Alergia e Resposta IgE: Identificação e Caracterização de alergénios de *Dactylis glomerata* L. e de *Phleum pratense* L. Trabalho de de projecto para a disciplina de Laboratórios I, Universidade de Évora p. 127, 2008.

D

D'Amato, G; Urban air pollution and plant-derived respiratory allergy. *Clinical and Experimental Allergy* v. 30, p.628-636, 2000.

D'Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T. and Van Cauwenberge, P ; Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*, v.62, p. 976– 990, 2007.

Davies, J. M.; Bright, M. L.; Rolland, J. M.; O'Hehir, R. E. Bahia grass pollen specific IgE is common in seasonal rhinitis patients but has limited cross-reactivity with Ryegrass. *Allergy*, v. 60, n.2, p. 251-255, 2005.

Dias S. S. Avaliação da Qualidade e Autenticidade de Derivados de Leite de Búfala Encontrados no Varejo do Rio de Janeiro. UFRRJ Instituto de tecnologia Programa de Pós Graduação em Ciências e ecnologia de Alimentos, 2009.

Duffort O, Quintana J, Ipsen H, Barber D, Polo F, Antigenic similarity among group 1 allergens from grasses and quantitation ELISA using monoclonal antibodies to Phl p 1, Int Arch Allergy Immunol., v.145, p.283-90, 2008.

E

Emon, J. M. V.; Immunoassay and other Bioanalytical Techniques; Taylor & Francis, London, New York; CRC Press, 2007.

F

Fahlbusch, B.; Hornung, D.; Heinrich. J.; Dahse, H. M.; Jager, L. Quantification of group 5 grass pollen allergens in house dust. Clinical and Experimental Allergy, Oxford, v. 30, n. 11, p. 1645-1652, 2000.

Fahlbusch, B.; Hornung, D.; Heinrich. J.; Dahse, H. M.; Jager, L.; Cromwell, O.; Fiebig, H.; Detection and quantification of group 4 allergens in grass pollen extracts using monoclonal antibodies. Clinical and Experimental Allergy, p. 799-807, 1998.

Ferreira, F.; Wallner. M.; Thalhamer, J. Customized antigens for desensitizing allergic patients. Advances in Immunology, p. 79-129, 2004.

Feo Brito y Cols; Oleaceae. Descripción y distribución en España. En "Atlas de Aerobiología y Polinosis". Forum Siglo XXI. Schering Plough. 2000.

Ferro, S. L.; Estudo para o desenvolvimento de métodos para quantificação de *Ole e1* em amostras de ar atmosférico colhidas na cidade de Évora, Universidade de Évora p.102, 2010.

Ferro R., Lopes A. F., Moreira J. E., Coelho C., Caeiro E., Antunes C. M., Morais-Almeida M., Nunes C., Brandão R.; Ambient Air *Ole* e1 Content in Samples Collected in Évora (South Portugal) correlation with Airborne Olive Pollen and Year-to-year variation; 2nd International Congress Southern European Allergy Societies 2011 – Estoril, Portugal Respiratory and allergic diseases from childhood to oldeness, p.9, 2011.

G

Gaussorgues, R.; L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. Un risque allergique? The olive tree and its pollen in the Mediterranean basin. An allergy risk?; Revue française d'allergologie; v.49, 2009.

Gilfillan, A. M.; Tkaczyk; C. Integrated signalling pathways for mast- cell activation. Nature Reviews. Immunology, London, v.6, n.3, p. 218-230, 2006.

González , E. M., Villalba , M., Lombardero , M., Aalbers , M., Ree, R., Rodríguez, R.; Influence of the 3D-conformation, glycan component and microheterogeneity on the epitope structure of *Ole* e 1, the major olive allergen Use of recombinant isoforms and specific monoclonal antibodies as immunological tools; Molecular Immunology, v. 39,p. 93–101, 2002.

González, E. M., Villalba, M., Quiralte, J., Batanero, E., Roncal, F., Albar, J. P., Rodríguez, R.; Analysis of IgE and IgG B-cell immunodominant regions of *Ole* e 1, the main allergen from olive pollen; Molecular Immunology, v.43, p. 570–578, 2006

Gould, H. J.; Sutton, B. J.; Beavil, A. J.; Beavil, R.L.; Maccloskey, N.; Coker, H. A.; Fear, D; Smurthwaite, L. The biology of IGE and the basis of allergic disease. Annual Review of Immunology, Palo Alto. v.21, p. 579-628, 2003.

H

Hernández J. J. G. Detección de los niveles de proteínas alergénicas en el aire de *Olea europaea* (*Ole e 1*) cuantificación por métodos inmunológicos. Universidad politécnica de cartagena departamento de ingeniería química y ambiental, 2010.

I

Ishizaka, K.; Ishizaka, T. Physicochemical properties of reaginic antibody. 1. association of reaginic activity with an immunoglobulin other than gamma A-or gamma G-globulin. *Journal of Allergy*, p.169-185, 1966.

J

Johansson, S. G. O.; O'B-Houruhane, J.; Bousquet, J.; Bruijnzeelkoomen, .; Dreborg, S.; Mygind, N.; Ring, J.; Van Cauwenberge, P.; An Hage-hamsten, M.; Wuthrich, B. A revised nomenclature for allergy. An AACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*, v. 56, n. 9, p. 813-824, 2001.

Johansson, S. G.; Bieber, T.; Dahl, R.; Friedmann, P.S.; Lanier, B. Q.; Lockey, R. F.; Motala, C.; Ortega Martell, J. A.; Platts- Mills, T. A. E.; Ring, J.; Thien, F.; Van Cauwenberge.; P.; Williams, H. C. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the world Allergy Organization, October 2003. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, n.5, p.832-836, 2004.

Jutel, M.; Jaeger, L.; Suck, R.; Meyer, H.; Fiebig, H.; Cromwell, O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, n.3, p. 608-613, 2005.

K

Kaliner, M. A., Lockey, R. F., Allergens and Allergen Immunotherapy (4^{ed}); Tree Pollen Allergens, p.87-105, 2008.

King, T.P.; Hoffman, D.; Lowenstein, H.; Marsh, D.G.; Platts- Mills, T. A. E.; Thomas, W. Allergen nomenclature. Allerg, p. 765-774, 1995.

King, T.P.; Hoffman, D.; Lowenstein, H.; Marsh, D.G.; Platts- Mills, T. A. E.; Thomas, W. Allergen nomenclature. International Archived of Allergy and Immunobloting, Basel, v.105, n.3, p.224-233, 1994.

Knox, R. B. Pollen and allergy. London: Edward Arnold Limited, p.60, 1979.

Knox, R. B.; Suphioglu, C. Environmental and molecular biology of pollen allergens. Trends in Plant Science, London, v.1, n. 5, p.156-164, 1996.

L

Lemanske-Junior, R. F.; Busse, W. W. Asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology, p. S 502-519, 2003.

Levetin, E.; Methods for Aeroallergen Sampling; 2004.

Liccardi, G.; Kordash, T. R.; Russo, M.; Noschese, P.; Califano, C.; D'Amato, M.; D'Amato, G. Why are nasal and bronchial symptoms mostly perennial in patients with monosensitization to Ole europaea pollen allergens? Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, n. 6, p. 371-377, 1996.

Lopes A. F., Moreira J., Ferro R., Ribeiro R., Coelho C., Caeiro E., Antunes C, Lopes M. L., Brandão R., *Phi* p5 Content in Ambient Air Samples Collected in Evora (south Portugal): Year-to-year Variation and Correlation with airborne Grass Pollen, 2nd International

Congress Southern European Allergy Societies 2011 – Estoril, Portugal Respiratory and allergic diseases from childhood to oldeness, p.9, 2011.

M

Marsh, D. G.; Goodfried, L.; King, T. P.; Lowenstein, H.; Platts- Mills, T.A.E. Allergen nomenclature. Bulletin of the world Health Organization, Geneva, v., n.5, p. 767-770, 1986.

Meyer, P.; Klunker, S.; Zimmermann, M.; Akdis, C. A.; Akdis, M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. Allergy, Copenhagen, v.63, n.11, p. 1455-1463, 2008.

Mistrello, G.; Roncarolo, D.; Zanoni, D.; Zanotta, S.; Amato, S.; Falagiani, P.; Ariano, R. Allergenic relevance of Cupressus arizonica pollen extracts of the allergoid. International Archives of Allergy and Immunology, Basel, v. 129, n.4, p. 296-304, 2002.

Moverare R, Petays T, Vartiainen E, Haahtela T. IgE reactivity pattern to timothy and birch pollen allergens in Finnish and Russian Karelia. Int Arch Allergy Immunol, v.136: p.33-8, 2005.

N

Napoli, A., Aiello, D., Di Donna, L., Moschidis, P., Sindona, G.; Vegetable Proteomics: The Detection of Ole e 1 Isoallergens by Peptide Matching of MALDI MS/MS Spectra of Underivatized and Dansylated Glycopeptides; Journal of Proteome Research;7, p.2723–2732, 2008.

Niederberger, V.; Laffer, S.; Froschl, R.; Kraft, D.; Rumpold, H.; Kapiotis, S.; Valenta, R.; Spitzauer, S. IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p1, Phl2, Phl p5 and

Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, n.2, p. 258-264, 1998.

Niemeijer, N. R.; Kauffman, H. F.; Van Hove, W.; Dubois, A. E. J. Effect of dilution, temperature, and preservatives on the long-term stability of standardized inhalant allergen extracts. *Annals of Allergy and Asthma Immunology*, v. 76, n.6, p. 535-540, 1996.

R

Rodríguez-Rajo, F.J., Astray G, Ferreiro-Lage J.A., Aira M.J., Jato-Rodríguez M.V., Mejuto J.C.; Evaluation of atmospheric Poaceae pollen concentration using a neural network applied to a coastal Atlantic climate region, 2009.

Ring, J.; Kramer, U.; Schafer, T.; Behrendt, H. Why are allergies increasing? *Current Opinion in Immunology*, n.6, p.701-708, 2001.

Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D.; D. Roth. *Immunology*. 7ed., Baltimore: Mosby, 2006.

Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Palomares, O., Quiralte, J., Salamanca, G., Sirvent, S., Castro, L., Prado, N.; 2007; Olive Pollen Recombinant Allergens: Value in Diagnosis and Immunotherapy; *J Investig Allergol Clin Immunol*; v.17, p.56-62, 2007.

Rosário- Filho, N. A.; Villela, M. M. S. Quantitative skin prick test and serum IgE antibodies in atopic asthmatics. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, n.1, p. 40-45, 1997.

S

Schmidt-weber, C. B.; Blaser, K. Regulation and role of transforming growth factor-beta in immune tolerance induction and inflammation. *Current Opinion in Immunology*, n.6, p.709-716, 2004.

Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica (2011) [em linha] disponível em www.spaic.pt

Solomon, W. R. Aerobiology of pollinosis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, p. 449-461, 1984.

Stanley, R. G.; Linskens, H. F. Pollen. Biology- Biochemistry- Management. Berlin: Springer- Verlag, 1974.

Suck, R.; Hagen, S.; Cromwell, O.; Fiebig, H. The high molecular mass allergen fraction of timothy grass pollen (*Phleum pratense*) between 50-60 kDa is comprised of two major allergens: Phl p4 and Phl p 13. *Clinical and Experimental Immunology*, n. 10, p. 1395- 1402, 2000.

Suphioglu, C. What are the important allergens in grass pollen that are linked to human allergic disease ? *Clinical and Experimental Immunolog*, nº10, p.1335-1341, 2000.

T

Taketomi, Ernesto Akio, Sopelete, Mônica Camargo; Moreira, Priscila Ferreira de Sousa and Vieira, Francisco de Assis Machado; Pollen allergic disease: pollens and its major allergens. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.v.72*, nº4, p.562-567, 2006

Todo-Bom A, Brandão R, Nunes C, Caeiro E, Leitão T, Ferraz-Oliveira J, Morais-Almeida M, Tipos polínicos alergisantes em Portugal. Rev Port Imunoalergologia. v.14 p.41-49 2006.

W

Weber, R. W.; Patterns of pollen cross- allergenicity. Journal of Allergy and clinical Immunology, n. 2, p. 229-239, 2003.

www.alergome.com (visto a Outubro de 2011)

9. Anexos

Anexo 1

Figura 19. Prevalência da sensibilização a proteínas de *Phleum* e *Olea* na população em estudo. (A). Total de Pacientes sensíveis quer á Olea total, Ole e1, Ole e2 quer ao Phleum total, Phl p 5, Phl p 1. (B) Pacientes que apresentam sensibilidade Phleum total, Phl p 5, Phl p 1. (C) Pacientes que apresentam sensibilidade Olea total, Olea e 1, Ole e 2.

A)

	Phleum	Phleum 1	Phleum 5	Olea	Olea 1	Olea 2
Total %	72	73	48	48	33	21
Sexo M %	31	34	24	24	15	7
Sexo F %	41	39	24	24	18	14

B)

	Sens. Phl,Phl1 e Phl5	Sens. Phl e Phl1	Sens. Phl e Phl5	Sens. Phl	Sens. Phl1	Sens. Phl5
Total %	42	15	1	6	9	3
Sexo M %	20	9	0	2	4	3
Sexo F %	23	6	1	5	5	0

C)

	Sens.Olea, Olea1 e Olea2	Sens.Olea e Olea1	Sens. Olea e Olea2	Sens. Olea	Sens. Olea2	Sens. Olea1
Total %	16	15	3	13	1	1
Sexo M %	6	8	1	9	0	1
Sexo F %	10	8	2	4	1	0

Anexo 2

Figura 24. Correlação entre a intensidade relativa dos sintomas e as contagens polínicas (A) ($p > 0,05$) e os aeroalergénios (B) ($p < 0,05$).

A)

Summary

	Intercept		Slope		Statistics
	Value	Error	Value	Error	Adj. R-Square
B	6,27011	4,76111	0,02656	0,01011	0,59607

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
B	Model	1	213,91313	213,91313	6,30259	0,07851
	Error	3	92,9708	30,99027		
	Total	4	306,88393			

B)

Summary

	Intercept		Slope		Statistics
	Value	Error	Value	Error	Adj. R-Square
B	7,40988	2,76582	0,01044	0,00241	0,81628

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
B	Model	1	264,59734	264,59734	18,77172	0,02268
	Error	3	42,28659	14,09553		
	Total	4	306,88393			

Anexo 3

Correlação de Speraman entre: A) grãos de pólen e os alergénios; B) Alergénios e os Sintomas; C) Sintomas e os grãos de pólen.

Correlations

			somagrao	somproteinas
Spearman's rho	somagrao	Correlation Coefficient	1.000	.685
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	87	87
	somproteinas	Correlation Coefficient	.685	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	87	87

A

Correlations

			somproteinas	sintomas
Spearman's rho	somproteinas	Correlation Coefficient	1.000	.534
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	87	87
	sintomas	Correlation Coefficient	.534	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	87	87

B

Correlations

			sintomas	somagrao
Spearman's rho	sintomas	Correlation Coefficient	1.000	.563
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	87	87
	somagrao	Correlation Coefficient	.563	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	87	87

C