



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Alergénios do pólen de oliveira (*Olea europaea*): os níveis de exposição e a sua relevância para a sintomatologia alérgica numa população do Alentejo

Joana Rita Venâncio Candeias

Orientação: Prof. Dra. Célia Antunes

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2015



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Alergénios do pólen de oliveira (*Olea europaea*): os níveis de exposição e a sua relevância para a sintomatologia alérgica numa população do Alentejo

Joana Rita Venâncio Candeias

Orientação: Prof. Dra. Célia Antunes

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2015

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| Índice de Figuras | iii |
| Índice de Tabelas | vi |
| Abreviaturas e convenções | vii |
| Agradecimentos..... | xii |
| Resumo | xiii |
| Abstract | xiv |
| Introdução..... | 1 |
| 1.1. O Pólen e seus Alergénios | 1 |
| 1.1.1. <i>Olea europaea</i> : distribuição do pólen de oliveira na Península Ibérica | 1 |
| 1.1.2. caracterização do conteúdo em alergénios do pólen..... | 3 |
| 1.2. Alergia – reações de hipersensibilidade do tipo I..... | 5 |
| 1.2.1. Fase de sensibilização | 7 |
| 1.2.2. Fase efetora – Reação imediata..... | 10 |
| 1.2.3. A ligação específica antigénio-Anticorpo | 13 |
| 1.2.4. Libertação de mediadores e reação inflamatória | 14 |
| 1.3. Metodologias utilizadas na determinação do perfil alergológico..... | 15 |
| 1.3.1. Padronização do extrato de pólen | 15 |
| 1.3.2. Métodos mais utilizados no diagnóstico de doenças alérgicas..... | 18 |
| 1.3.3. Uso de biosensores celulares: Linha celular RBL-h21. | 18 |
| 1.3.4. FACS..... | 20 |
| 1.3.5. SEM (Microscopia Eletrónica de Varrimento) | 21 |
| 2. Objetivos | 22 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 22 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 22 |
| 3. Problema..... | 23 |
| 4. Metodologia..... | 24 |
| 4.1. Procedimento Experimental | 24 |
| 4.1.1. Extração do alergénio <i>Olea europaea</i> a partir de pólen natural..... | 24 |
| 4.1.2. Quantificação da proteína pelo método de Bradford | 24 |
| 4.1.3. IEF para deteção de alergénio..... | 24 |
| 4.1.4. SDS-PAGE para deteção do alergénio..... | 26 |
| 4.1.5. Western-Blot para obtenção dos alergogramas..... | 27 |
| 4.1.6. Imunoensaio biológico com linha celular RBL-h21 – Libertação de β -Hexosaminidase..... | 28 |
| 4.2. Material e Equipamento | 30 |
| 4.3. Reagentes | 31 |
| 5. Resultados e discussão | 33 |
| 5.1. Parte I – caracterização de um extrato de pólen: perfil proteico e alergológico para a população em estudo | 33 |

| | | |
|--------|--|----|
| 5.1.1. | Determinação da concentração de um Extrato de pólen de oliveira..... | 33 |
| 5.1.2. | Determinação do perfil proteico em função do pI | 34 |
| 5.1.3. | Determinação do perfil proteico em função da massa molecular | 34 |
| 5.1.4. | Western Blot e alergogramas obtidos para extração de pólen | 36 |
| 5.2. | Parte II – Desenvolvimento do bioensaio para avaliação da carga alérgica em amostras | 39 |
| 5.2.1. | Estabelecimento da cultura celular RBL-h21 | 39 |
| 5.2.2. | Check List – Lista de verificação | 40 |
| 5.2.3. | Otimização do ensaio e seleção do lote de células | 42 |
| 5.2.4. | Determinação da concentração de IgE para a sensibilização das células | 46 |
| 5.2.5. | Titulação de soro com resposta pelas células RBL-h21 já conhecida..... | 48 |
| 5.2.6. | Libertação de β -hexosaminidase em Soros de pacientes da região do Alentejo..... | 48 |
| 6. | Conclusão | 51 |
| | Referências | 52 |
| | Anexo I – Curva de Calibração da Proteína | 55 |
| | Anexo II – Curva de Calibração de massas moleculares..... | 55 |
| | Anexo III – Composição de tampões utilizados | 56 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA OLIVEIRA EM PORTUGAL [2]..... | 2 |
| FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO PÓLEN EM ESPANHA. ADAPTADO DE GUTIÉRREZ, 2011 | 2 |
| FIGURA 3 - IMAGEM DO PÓLEN DE <i>OLEA EUROPAEA</i> OBTIDA POR MICROSCOPIA ÓTICA. OS GRÃOS DE PÓLEN FORAM CORADOS COM FUCSINA BÁSICA PARA OBSERVAÇÃO (AMPLIAÇÃO 100X). (ADAPTADO DE SMITH, 2000). | 3 |
| FIGURA 4 - SDS-PAGE DE DOZE LOTES DIFERENTES DE <i>OLEA EUROPAEA</i> . AS LANES DE 1 A 6 CORRESPONDEM A PÓLEN PROVENIENTE DA ESPANHA ENQUANTO OS RESTANTES CORRESPONDEM A PÓLEN COLHIDO NOS EUA. (ADAPTADO DE CARNÉS & FERNÁNDEZ-CALDAS, 2002) | 4 |
| FIGURA 5 - MECANISMO GERAL DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO I. ADAPTADO DE (KINDT, OSBORNE, & GOLDSBY, 2006)..... | 6 |
| FIGURA 6 - MECANISMOS ENVOLVIDOS NA FASE DE SENSIBILIZAÇÃO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO I. ADAPTADO DE (LARCHÉ, AKDIS, & VALENTA, 2006) | 7 |
| FIGURA 7 – ESQUEMA SIMPLIFICADO REPRESENTANDO A ESTRUTURA DO ANTICORPO (ADAPTADO DE (PROTEINTECH, 2015)) | 10 |
| FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO RECETOR DE ALTA AFINIDADE PARA A IGE, FcεRI (KINDT, OSBORNE, & GOLDSBY, 2006)..... | 11 |
| FIGURA 9 – ATIVAÇÃO DOS MASTÓCITOS POR ALERGÉNIOS. A E C: MASTÓCITO EM REPOUSO (A - IMAGEM DE UM MASTÓCITO POR MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO ELETRÓNICA, C - IMAGEM REPRESENTATIVA DO MASTÓCITO COM O RECETOR DE ALTA AFINIDADE PARA A IGE, A VERDE, E O ANTICORPO IGE, A AMARELO, CONTENDO VÁRIOS GRÂNULOS CITOPLASMÁTICOS). QUANDO UM ALERGÉNIO (A VERMELHO) É RECONHECIDO PELOS ANTICORPOS, ESTES LIGAM-SE AO COMPLEXO RECETOR FcεRI-IGE, NA SUPERFÍCIE DOS MASTÓCITOS, LIBERTANDO PARA FORA DA CÉLULA O CONTEÚDO DOS GRÂNULOS, COMO SE OBSERVA NA IMAGEM POR MICROSCOPIA ELETRÓNICA (B) E PELA IMAGEM REPRESENTATIVA (D). ADAPTADO DE (AKDIS & AGACHE, 2014) | 12 |
| FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TRANSFERÊNCIA ELECTROFORÉTICA NO WESTERN BLOT. ADAPTADO DE WWW.PIERCENET.COM | 17 |
| FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA DE WESTERN BLOT, NO MÉTODO INDIRETO. ADAPTADO DE (SCIENTIFIC, 2009) | 17 |
| FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO IMUNOENSAIO, UTILIZANDO A CULTURA CELULAR RBL (ADAPTADO DE PROTOCOLO FORNECIDO PELO ZAUM) | 20 |
| FIGURA 13 - POLIMERIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA, COM USO DE LUZ FOTOPOLIMERIZADORA | 25 |
| FIGURA 14 - EQUIPAMENTO DA CORRIDA ELECTROFORÉTICA PARA TÉCNICA DE FOCAGEM ISOELÉTRICA | 25 |
| FIGURA 15 - SISTEMA DE SDS-PAGE, COM AMOSTRAS E PADRÕES JÁ APLICADAS NOS RESPECTIVOS POÇOS | 27 |
| FIGURA 16 - FRASCO DE CULTURA DE CÉLULAS COM CULTURA CELULAR RBL-H21..... | 28 |
| FIGURA 17 - ESQUEMA DE AÇÃO DE CADA CONTROLO UTILIZADO NO IMUNOENSAIO COM CULTURA CELULAR RBL. (ADAPTADO DE PROTOCOLO FORNECIDO PELO ZAUM) | 30 |
| FIGURA 18 - GEL DE POLIACRILAMIDA OBTIDO COM APLICAÇÃO DE AMOSTRAS DE <i>OLEA EUROPAEA</i> E <i>QUERCUS</i> E DOIS PADRÕES DIFERENTES APLICADOS. AS BANDAS CORRESPONDENTES PARA O PADRÃO DA BIO-RAD ESTÃO SINALIZADAS NA FIGURA. | 34 |
| FIGURA 19 - PERFIL PROTEICO DE <i>OLEA EUROPAEA</i> . COMPARAÇÃO DAS BANDAS VISÍVEIS COM PADRÃO APLICADO NO GEL E RESPECTIVAS BANDAS VISÍVEIS DE <i>OLEA</i> IDENTIFICADAS PELAS LETRAS DE A A H. FORAM APLICADAS DUAS AMOSTRAS DO EXTRATO DE <i>OLEA EUROPAEA</i> NO GEL, VISÍVEIS NA FIGURA... .. | 35 |
| FIGURA 20 - IMAGEM DE UMA MEMBRANA DE PVDF APÓS INCUBAÇÃO EM SOLUÇÃO DE PONCEAU S, A PARTIR DE GEL DE SDS-PAGE. FORAM ADICIONADOS NO GEL AMOSTRAS DE EXTRATOS DE <i>OLEA EUROPAEA</i> . NA FIGURA ESTÃO SINALIZADAS AS MASSAS MOLECULARES RELATIVAS ÀS BANDAS DO PADRÃO UTILIZADO. | 36 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 21 – IMAGEM DA REVELAÇÃO DA MEMBRANA DE WESTERN BLOT. A MEMBRANA FOI CORTADA EM QUATRO TIRAS DISTINTAS, CADA UMA COM UMA LANE DE <i>OLEA EUROPAEA</i> , EM QUE CADA TIRA FOI INCUBADA COM UM SORO DIFERENTE, INDICADO NA FIGURA. | 36 |
| FIGURA 22 – IMAGEM DE UMA MEMBRANA DE PVDF COM VISÍVEL OBSERVAÇÃO DE BANDAS OBTIDAS NO GEL DE SDS-PAGE. NO GEL FORAM APLICADAS AMOSTRAS DE EXTRATO DE <i>OLEA EUROPAEA</i> E <i>QUERCUS ROTUNDIFOLIA</i> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, PARA ALÉM DE DOIS PADRÕES DISTINTOS. A MEMBRANA TRANSFERIDA FOI CORTADA EM DUAS TIRAS PARA SER INCUBADA COM DOIS SOROS, INDICADOS NA FIGURA. | 38 |
| FIGURA 23: IMAGEM DA MEMBRANA COM AMOSTRAS DE <i>QUERCUS ROTUNDIFOLIA</i> E <i>OLEA EUROPAEA</i> APÓS A REVELAÇÃO. FORAM ADICIONADAS VÁRIAS AMOSTRAS DE CADA EXTRATO, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA TENTAR OBTER UM MAIOR NÚMERO DE BANDAS REATIVAS. A MEMBRANA FOI DIVIDIDA EM DUAS TIRAS PARA INCUBAÇÃO COM DOIS SOROS DISTINTOS (PC 201 37077 E PC 203 98986). AS BANDAS IDENTIFICADAS ESTÃO IDENTIFICADAS PELOS NÚMEROS DE 1 A 10. A IMAGEM AO LADO É UMA IMAGEM DA MEMBRANA ANTES DA INCUBAÇÃO ONDE É POSSÍVEL OBSERVAR COM MELHOR NITIDEZ AS BANDAS RELATIVAS AO PADRÃO DA BIO-RAD. OS PI'S CORRESPONDENTES ÀS BANDAS DO PADRÃO ENCONTRAM-SE IDENTIFICADOS NA FIGURA. | 38 |
| FIGURA 24 - IMAGEM OBTIDA A PARTIR DAS CÉLULAS CULTIVADAS, DA LINHA CELULAR RBL-H21, POR SEM. AS CÉLULAS FORAM LAVADAS EM TAMPÃO PBS E FIXADAS DE MODO A PODEREM SER VISUALIZADAS NO SEM. | 40 |
| FIGURA 25 - À ESQUERDA, IMAGEM DA LINHA CELULAR OBTIDA POR SEM, EM 2014 E À DIREITA, IMAGEM OBTIDA COM LINHA CELULAR RBL-H21, EM 2010. | 40 |
| FIGURA 26 - CURVA DE ESTIMULAÇÃO DE IGE-AIGE. LIBERTAÇÃO DE B-HEXOSAMINIDASE EM CÉLULAS DA CULTURA CELULAR RBL-H21, DETERMINADA ATRAVÉS DO IMUNOENSAIO BIOLÓGICO. | 43 |
| FIGURA 27 - VALORES DE MÉDIAS DE OD'S OBTIDAS NOS ENSAIOS ENTRE MARÇO E MAIO, NAS CÉLULAS DA CULTURA CELULAR RBL-H21, ONDE SE ADICIONOU 1% DE TRITON X-100, CORRESPONDENTE À LIBERTAÇÃO TOTAL DE B-HEXOSAMINIDASE PELAS CÉLULAS. | 43 |
| FIGURA 28 - ANÁLISE FACS DAS CÉLULAS CONGELADAS EM 2009 (DILUIÇÃO 1:50), PARA IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS RBL-H21 QUE EXPRESSAM O AFC ϵ RI. O QUADRANTE 4 (Q4) REPRESENTA A PERCENTAGEM DE CÉLULAS ANALISADAS DURANTE A ANÁLISE QUE EXPRESSAM O RECETOR ESPECÍFICOS PARA A IGE HUMANA. | 44 |
| FIGURA 29 - ANÁLISE FACS DAS CÉLULAS CONGELADAS EM 2007 (DILUIÇÃO 1:50), PARA IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS RBL-H21 QUE EXPRESSAM O AFC ϵ RI. O QUADRANTE 4 (Q4) REPRESENTA A PERCENTAGEM DE CÉLULAS ANALISADAS DURANTE A ANÁLISE QUE EXPRESSAM O RECETOR ESPECÍFICOS PARA A IGE HUMANA. | 45 |
| FIGURA 30 - ANÁLISE FACS DAS CÉLULAS CONGELADAS EM 2010 (DILUIÇÃO 1:50), PARA IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS RBL-H21 QUE EXPRESSAM O AFC ϵ RI. O QUADRANTE 4 (Q4) REPRESENTA A PERCENTAGEM DE CÉLULAS ANALISADAS DURANTE A ANÁLISE QUE EXPRESSAM O RECETOR ESPECÍFICOS PARA A IGE HUMANA. | 45 |
| FIGURA 31 – CURVA DE ESTIMULAÇÃO IGE-AIGE, EM CÉLULAS DA CULTURA CELULAR RBL-H21 DO ANO DE 2007 (A) E 2009 (B), PARA DETERMINAÇÃO DA LIBERTAÇÃO DE B-HEXOSAMINIDASE. TITULAÇÃO DA IGE PARA OTIMIZAÇÃO DO IMUNOENSAIO. AS CÉLULAS FORAM ESTIMULADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IGE E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIGE, USADAS NORMALMENTE PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA, DE MODO A ENCONTRAR A CONCENTRAÇÃO IDEAL DE IGE A UTILIZAR NO IMUNOENSAIO. | 46 |
| FIGURA 32 - PERCENTAGEM DO EFEITO DA IGE PARA AS CÉLULAS DE 2007 E 2009, NA CONCENTRAÇÃO DE ANTI-IGE DE 0,00741MG/ML. | 47 |
| FIGURA 33 – CURVA DE ESTIMULAÇÃO DE IGE-AIGE, EM CÉLULAS DA CULTURA CELULAR RBL-H21, DO ANO DE 2007, PARA DETERMINAÇÃO DA LIBERTAÇÃO DE B-HEXOSAMINIDASE. TITULAÇÃO DE IGE PARA OTIMIZAÇÃO DO IMUNOENSAIO. AS CÉLULAS FORAM ESTIMULADAS COM DUAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ÓTIMAS DE IGE (0,362 μ G/ML E 0,2 μ G/ML) NA FIGURA A E COM TRÊS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ÓTIMAS DE IGE (1 μ G/ML; 0,362 μ G/ML E 0,16 μ G/ML) NA FIGURA B, OBTIDAS EM ENSAIOS ANTERIORES E AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIGE USADAS NORMALMENTE PARA A CONSTRUÇÃO DA CURVA. | 47 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 34 – CURVA DE ESTIMULAÇÃO IGE-AIGE, EM CÉLULAS DA CULTURA CELULAR RBL-H21, DO ANO DE 2007, PARA DETERMINAÇÃO DA PERCENTAGEM DE LIBERTAÇÃO DE B-HEXOSAMINIDASE. TITULAÇÃO DO SORO UTILIZADO COMO CONTROLO POSITIVO PARA O IMUNOENSAIO. O SORO, PROVENIENTE DE UM PACIENTE DE MUNIQUE, ALÉRGICO A PHL P5, FOI TITULADO EM TRÊS DIFERENTES DILUIÇÕES (1:25, 1:16 E 1:10) COM O OBJETIVO DE VERIFICAR A RESPOSTA PELAS CÉLULAS. | 48 |
| FIGURA 35 - CURVA DE ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS DA CULTURA CELULAR RBL-H21, PARA DETERMINAÇÃO DA PERCENTAGEM DE LIBERTAÇÃO DE B-HEXOSAMINIDASE. TITULAÇÃO DO SORO DO PACIENTE (PC 20107207), ESTIMULADO COM EXTRATO OBTIDO DO CHEMVOL®, NA CIDADE DE ÉVORA NO ANO DE 2011. | 49 |
| FIGURA 36 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE PROTEÍNA. A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA FOI REALIZADA PELO MÉTODO DE BRADFORD, UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BSA, QUANTIFICANDO-SE AS AMOSTRAS A 630NM. | 55 |
| FIGURA 37 CURVA DE CALIBRAÇÃO DE DISTÂNCIA VS LOGARITMO DA MASSA MOLECULAR | 55 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DOS DIFERENTES ALERGÉNIOS DE <i>OLEA EUROPAEA</i> | 3 |
| TABELA 2 - PRODUTOS DOS MASTÓCITOS E EFEITOS BIOLÓGICOS. ADAPTADO DE (AKDIS & AGACHE, 2014) | 12 |
| TABELA 3 - VALORES DE OD E DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA OBTIDA NAS DIFERENTES DILUIÇÕES DO EXTRATO DE <i>OLEA EUROPAEA</i> , PELO MÉTODO DE BRADFORD. | 33 |
| TABELA 4 - VALORES DE MASSAS MOLECULARES RELATIVAS PARA O EXTRATO DE <i>OLEA EUROPAEA</i> , DE ACORDO COM O GEL DE SDS-PAGE OBTIDO NA FIGURA 18. OS VALORES DE MASSA MOLECULAR FORAM OBTIDOS ATRAVÉS DA INTERPOLAÇÃO DA RETA DISTÂNCIA VS LOG MM CONSTRUÍDA A PARTIR DOS VALORES DE MASSA MOLECULAR DAS BANDAS OBTIDAS NO PADRÃO, COLOCADO NO MESMO GEL. | 35 |
| TABELA 5 - SOROS REATIVOS E RESPECTIVAS BANDAS OBTIDAS PELA MEMBRANA DE WESTERN BLOT. AS MEMBRANAS FORAM MARCADAS TRÊS VEZES UTILIZANDO A TÉCNICA DE <i>STRIPPING</i> , O QUE PERMITIU A VISUALIZAÇÃO DE MAIS BANDAS REATIVAS PARA CADA SORO REATIVO. NA ÚLTIMA COLUNA ENCONTRA- SE A POSSÍVEL CORRESPONDÊNCIA COM OS ALERGÉNIOS CONHECIDOS DE <i>OLEA EUROPAEA</i> | 37 |
| TABELA 6 - VALORES DE PI CORRESPONDENTES ÀS BANDAS IMUNORREATIVAS OBTIDAS PELA MEMBRANA DA FIGURA 22. OS NÚMEROS CORRESPONDEM ÀS BANDAS REATIVAS COM O EXTRATO DE <i>OLEA EUROPAEA</i> E AO LADO O RESPECTIVO PI PARA CADA BANDA. NA COLUNA AO LADO ENCONTRA-SE A POSSÍVEL CORRESPONDÊNCIA COM OS ALERGÉNIOS CONHECIDOS DE <i>OLEA EUROPAEA</i> | 39 |
| TABELA 7 - LISTA DE VERIFICAÇÃO CONSTRUÍDA PARA A REALIZAÇÃO DO IMUNOENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DA LIBERTAÇÃO DE B-HEXOSAMINIDASE. | 41 |
| TABELA 8 - RESULTADOS DO ENSAIO DE LIBERTAÇÃO DE B-HEXOSAMINIDASE OBTIDA EM CÉLULAS DA LINHA CELULAR RBL-H21: VALORES DE OD PARA AS CÉLULAS SENSIBILIZADAS COM IGE E ANTI-IGE, SUA RESPECTIVA PERCENTAGEM DE LIBERTAÇÃO DE B-HEXOSAMINIDASE E RESPECTIVOS VALORES PARA OS CONTROLOS DO ENSAIO. | 42 |
| TABELA 9 - RESULTADOS DO ENSAIO DE LIBERTAÇÃO DE B-HEXOSAMINIDASE OBTIDA EM CÉLULAS DA LINHA CELULAR RBL-H21: VALORES DE OD PARA AS CÉLULAS SENSIBILIZADAS COM IGE (C=1µG/ML) E ANTI- IGE, SUA RESPECTIVA PERCENTAGEM DE LIBERTAÇÃO DE B-HEXOSAMINIDASE E RESPECTIVOS VALORES PARA OS CONTROLOS DO ENSAIO. | 46 |
| TABELA 10 - RESULTADOS DA TITULAÇÃO DO SORO DO PACIENTE (PC 20386963) E RESPECTIVOS VALORES OBTIDOS PARA OS CONTROLOS DO IMUNOENSAIO. AS CÉLULAS FORAM ESTIMULADAS COM EXTRATO OBTIDO DO CHEMVOL®, NA CIDADE DE ÉVORA NO ANO DE 2011, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.. | 49 |
| TABELA 11 - RESULTADOS DA TITULAÇÃO DO SORO DO PACIENTE (PC 20334446) E RESPECTIVOS VALORES OBTIDOS PARA OS CONTROLOS DO IMUNOENSAIO. AS CÉLULAS FORAM ESTIMULADAS COM EXTRATO OBTIDO DO CHEMVOL®, NA CIDADE DE ÉVORA NO ANO DE 2011, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.. | 50 |

ABREVIATURAS E CONVENÇÕES

- 3D: tridimensional
- g : força gravitacional
- g : gramas
- rpm: rotações por minuto
- ACTH: adrenocorticotrofina, do inglês “*Adrenocorticotropic Hormone*”
- APC: Células Apresentadoras de Antígeno, do inglês “*Antigen-Presenting Cell*”
- APC-A: Aloficocianina, do inglês “*Allophycocyanin*”
- B_{reg} : linfócitos B de regulação
- BSA: Albumina do Soro Bovino, do inglês “*Bovine Serum Albumin*”
- c : concentração
- Ca^{2+} : íon cálcio
- $CaCl_2$: Cloreto de Cálcio
- CO_2 : Dióxido de Carbono
- Cu: cobre
- C_{ϵ} : cadeia pesada da imunoglobulina
- D_2O : óxido de deutério
- DNA: Ácido desoxirribonucleico, do inglês “*Deoxyribonucleic Acid*”
- DTT: Ditioneitol
- EAACI: European Academy of Allergy and Clinical Immunology
- ELISA: do inglês “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”
- EUA: Estados Unidos da América
- Fab: fragmento de ligação ao antígeno, do inglês “*fragment, antigen-binding*”
- FACS: Fluorescence Assisted Cell Sorting
- F_c : região efetora da Imunoglobulina
- FCS: Soro Fetal Bovino
- $Fc\epsilon RI$: recetor de alta afinidade para a IgE
- FMN: riboflavina
- FSC: Forward SCatter
- G418 – sulfato de geneticina
- H_2O : água destilada
- HCl: ácido clorídrico
- HEPES: N-(2-Hidroxietil)-piperazina-N -(2-etanosulfónico)
- IEF: Isoelectrofocalização, do inglês “*Isoelectric Focusing*”
- IFN- γ : interferão gama
- IgA: Imunoglobulina A
- IgE: imunoglobulina E
- IgG: imunoglobulina G

- IL: interleucina
- ITAM: motivo de ativação de imunoreceptor baseado em tirosina
- KCl: Cloreto de Potássio
- kDa: kilodalton, unidade de massa atômica
- LTP: proteínas de transporte de lípidos, do inglês "*Lipid Transfer Protein*"
- MEM: Meio Mínimo Essencial, do inglês "*Minimum Essential Medium*"
- MgCl₂: Cloreto de Magnésio
- MM: massa molecular
- NaCl: Cloreto de Sódio
- NK: células *Natural Killer*
- OD: Densidade ótica
- PBS: Tampão fosfato-salino
- Pen-strep: penicilina-streptomina
- pNAG: p-nitrofenil –N– acetil-D-glucosaminida
- PVDF: fluoreto de polivinilideno
- PVP: poli-vinil-pilorriona
- PSA: persulfato de amônio
- RAST: radioalergosorbent test
- RBL: Basófilos de rato com leucemia, do inglês "Rat Basophilic Leukemia"
- sd: de *standard deviation*, desvio padrão
- SDS-PAGE: dodecil-sulfato de sódio (SDS) de poli(acrilamida (PAGE), do inglês "*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*"
- SPT: Skin Prick Test
- SOD: superóxido dismutase
- SSC: Side SCarter
- TBS-T: Tampão Tris-salino com Tween® 20
- TCR: receptor de linfócitos T
- TEMED: N, N, N', N' – tetrametilenodiamina
- TGF-β: fator de transmissão de crescimento beta
- Th: Linfócitos T auxiliaries, do inglês "T helper *cells*"
- TNF: Fator de Necrose Tumoral, do inglês "*Tumor necrosis factor*"
- Tris: Trisaminometano
- ZAUM - Zentrum Allergie und Umwelt
- Zn: Zinco

Ao Prof. Dr. Rui Brandão que, apesar de já não estar presente entre nós, sem ele não tinha sido possível iniciar este estudo. O seu conhecimento foi e será sempre uma mais-valia.

Projeto financiado por:

Bayerische Forschungstiftung, PIZ-193-12

ICAAM, PEst-C/AGR/UI0115/2011

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Célia Antunes, por tudo. Por ser minha orientadora e me transmitir o seu conhecimento e experiência durante todo este percurso académico. Em especial por me ter proporcionado esta maravilhosa experiência em Munique, que se tornou muito mais do que os dois meses planeados e que sem ela era impossível ter acontecido. Um muito obrigado.

À Prof. Dra. Ana Costa, por todo o seu conhecimento e experiência transmitidos e por todo o seu apoio durante todo o percurso académico.

À Universidade de Évora, em especial aos docentes com quem tive a possibilidade de ter aulas e que me transmitiram todos os conhecimentos. Sei que são dos melhores e muito importantes para esta etapa fora do país, onde todo o conhecimento que adquiri com eles me fazem dizer com orgulho o quanto aprendi e o quanto sou capaz de fazer graças a eles e o quanto é apreciado esse vasto conhecimento (teórico e principalmente prático) cá fora.

À Dra. Luísa Lopes e todo o pessoal responsável do Hospital Espírito Santo de Évora pela cooperação e fornecimento dos soros utilizados neste estudo.

Ao Prof. Dr. Jeroen Buters, por esta oportunidade no ZAUM, pela experiência que me vai proporcionando, por me incentivar sempre e por acreditar em mim. A todo o seu grupo que, de uma forma ou de outra me ajudou, em especial à Angelina Przychodzki's, pela amizade construída.

Aos meus pais, porque sem eles não poderia ter chegado aqui. Por todo o esforço que fizeram, pelo carinho e força que, mesmo a muitos quilómetros de distância me conseguiram sempre transmitir e por mesmo longe acreditarem que era possível, e que continua a ser possível, um futuro. Um enorme agradecimento à minha irmã, que foi e será sempre um exemplo para mim.

À minha colega de laboratório e, incrivelmente, minha afilhada de praxe, Sara Anacleto, por ter sido uma ótima companheira de muitas e longas horas de trabalho de laboratório e de pesquisa, por toda a amizade que a Universidade nos proporcionou, de uma forma ou de outra.

À Sofia Ribeiro, por me ouvir e me acompanhar, quer perto, quer a milhares de quilómetros de distância.

Às minhas amigas e colegas de licenciatura, Cristiana, Flávia, Joana e Silvânia, que mesmo já com rumos diferentes me apoiaram. À Silvânia e à Flávia em especial, por me fazerem acreditar que é possível fazer um projeto sobre vinhos enquanto se está na Alemanha a trabalhar e a escrever a tese ao mesmo tempo!

À Juliana, mais que madrinha de praxe, por estar lá e por ser um exemplo de que era possível fazer tudo isto.

Ao meu afilhado Alexandre que há muito me adivinhava o futuro e que sempre está pronto para me dar uma palavra de incentivo.

A muitos colegas bioquímicos que foram acreditando em mim durante este percurso e me apoiaram em muitos sentidos.

Aos meus colegas de mestrado que me ajudaram a alcançar o final desta etapa. Em especial à Patrícia Santos, por toda a companhia durante o primeiro ano, pelo apoio que, apesar de mútuo, foi o crucial para estar a terminar agora.

RESUMO

Alergénios do pólen de oliveira (*Olea europaea*): os níveis de exposição e a sua relevância para a sintomatologia alérgica numa população do Alentejo

A oliveira, uma espécie relevante na região do Alentejo, constitui uma das maiores causas de hipersensibilidade do tipo I. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar o perfil alergénico da *Olea europaea* no Alentejo, estudar a sensibilização a esta espécie nesta região e desenvolver um método que permita avaliar “in vitro” a resposta celular ao alergénio.

Preparou-se um extrato de pólen de oliveira cujo perfil alergológico foi estudado por Western-Blot, após separação das proteínas por IEF ou SDS-PAGE, utilizando soros de pacientes alérgicos (Consulta do Hospital do Espírito Santo de Évora – HESE). A taxa de desgranulação de células RBL-h21 foi usada como biosensor de alergenidade.

Os resultados evidenciam a presença de reatividade dos soros com *Olea europaea* com características semelhantes ao publicado. Os soros mais reativos mostraram efetivos em sensibilizar as células para os alergénios de oliveira. Assim, desenvolveu-se com sucesso um ensaio que permitirá avaliar a resposta biológica a alergénios.

ABSTRACT

Allergens from the olive tree pollen (*Olea europaea*): exposure levels and the relevance for the allergy symptoms in a population of Alentejo

Olive, an important tree in Alentejo, is the second most relevant cause of type I hypersensitivity. The aim of this work was to characterize the allergen profile, study the sensitization and develop a methodology to monitor cell response to olive allergens.

An extract of olive pollen was prepared and the allergen profile was evaluated by immunoblot, after IEF or SDS-PAGE, using sera from allergic patients (provided from Hospital do Espírito Santo de Évora – HESE). Allergen induced degranulation of RBL-h21 was used as a bioassay to monitor allergenicity. The protein content was determined by the Bradford method.

The immunoblot analysis showed reactivity between sera and several protein bands in keeping with the literature. The most reactive sera successfully induced sensitization of the RBL-h21 to olive allergens. In summary, a bioassay to monitor allergen-induced degranulation, thus, potentially allergic reaction was developed.

INTRODUÇÃO

1.1. O PÓLEN E SEUS ALERGÉNIOS

O pólen é uma estrutura biológica que funciona como um reservatório, onde se encontra o gametófito (elemento reprodutor masculino). Este reservatório é uma adaptação evolucionária da vida fora da água pois protege os gâmetas masculinos de condições adversas atmosféricas, permitindo assim que se continue o processo natural de polinização. O pólen é, em resultado da polinização anemófila, uma fonte de grandes partículas, transportadas pelo ar, contendo alergénios ou, neste caso, aeroalergénios. A importância de tipo de um pólen em particular, do ponto de vista alergológico, depende do potencial alergénico e da abundância desse pólen na atmosfera (Sofiev & Bergmann, 2013).

Os tipos polínicos mais relevantes do ponto de vista alergológico variam de acordo com a geografia, em resultado da botânica local. Enquanto na zona norte e centro da Europa existem essencialmente três tipos de pólenes alergénicos, as Gramíneas (família *Poaceae*, 10-35µm de diâmetro), a Ambrósia (uma erva daninha da família *Asteraceae*, 8µm de diâmetro) e a Bétula (uma árvore da família *Betulaceae*, 20µm de diâmetro) (Knox & SupNégui, 1996), no sul da Europa, em particular, na região mediterrânica, surge a oliveira (árvore da família *Oleaceae*, 18µm de diâmetro) como a segunda causa de polinose a seguir às gramíneas, sendo a bétula quase inexistente. A Ambrosia é uma planta invasora que tem vindo a alargar o seu território registando-se a ocupação de regiões cada vez mais a sul (Thibaudon, Sikoparija, Oliver, Smith, & A. Skjoth, 2014), no entanto, ainda não apresenta proporções problemáticas em Portugal.

Os grãos de pólen contêm diferentes tipos de proteínas solúveis, que estão localizados maioritariamente no citoplasma e na superfície, no exterior da parede ou no interior. Só um pequeno número destas proteínas são alergénicas e as que são têm uma massa molecular similar à maioria das enzimas (10-70kDa). Os alergénios de pólen são definidos pelas suas interações com o sistema imunitário humano, através da indução da produção de IgE específicas, que atuam como marcadores para a identificação, isolamento e clonagem dos genes que os codificam (Knox & SupNégui, 1996).

O nível de exposição aos alergénios, e consequentemente ao pólen, é um fator determinante na indução da alergia. A avaliação da quantidade de pólen no ar é obtida através do uso de captadores específicos que permite obter uma estimativa diária deste parâmetro. Os pólenes alergénicos são apenas 20-30% do total de pólen capturado por ano, contudo, durante a época da floração destas espécies, estes são os pólenes dominantes (Knox & SupNégui, 1996).

1.1.1. *OLEA EUROPAEA*: DISTRIBUIÇÃO DO PÓLEN DE OLIVEIRA NA PENÍNSULA IBÉRICA

A *Olea europaea*, ou oliveira, pertence à família *Oleaceae*, com mais de trinta géneros e seiscentas espécies descritas (Carnés & Fernández-Caldas, 2002). Esta árvore é fonte de madeira, fruta e óleo, sendo estes últimos muito apreciados pelas suas conhecidas propriedades saudáveis.

A oliveira é muito comum nas áreas do Mediterrâneo e em algumas partes da Austrália e América do Norte, onde constitui uma das maiores causas de hipersensibilidade do tipo I. Todos os anos, os elevados níveis do pólen de oliveira ocorrem entre maio e junho e as quantidades variam durante toda a época da primavera, dependendo das condições climáticas registadas durante a estação e, em particular, nos primeiros meses do ano (Carnés & Fernández-Caldas, 2002).

A oliveira encontra-se distribuída, em Portugal, no sul, centro e vale do Douro (Figura 1). Em relação ao pólen de *Olea*, a representação no espetro polínico varia de cidade para cidade (4% Porto, 14% Coimbra, 12% Lisboa, 9% Évora e 36% Portimão). No que diz respeito aos níveis polínicos, Porto e Coimbra têm os níveis mais baixos (465 e 2.178 grãos/pólen/m³/ano) e Portimão os mais elevados – 14.149 grãos/pólen/m³/ano. (Caeiro, et al., 2012)



FIGURA 1 - Distribuição geográfica da oliveira em Portugal [2]

Em Espanha, as concentrações polínicas também são elevadas especialmente em zonas de grande cultivo de oliveira, como Andaluzia, Córdoba e Jaén. Nas últimas duas cidades as concentrações médias diárias podem superar os 1000 grãos de pólen/m³. No que diz respeito aos valores por ano, de grãos de pólen, Jaén apresenta o valor médio mais elevado (49.094 grãos/pólen/m³/ano de pólen, seguida de Córdoba (15.667 grãos/pólen/m³/ano), Granada (14.459 grãos/pólen/m³/ano), Málaga (10.684 grãos/pólen/m³/ano) seguidas de Badajoz (6.274 grãos/pólen/m³/ano) e Cáceres (6.024 grãos/pólen/m³/ano), já com níveis mais inferiores. É possível concluir que a região de Andaluzia e Extremadura são as que apresentam mais concentração de pólen de oliveira (Figura 2). [4]

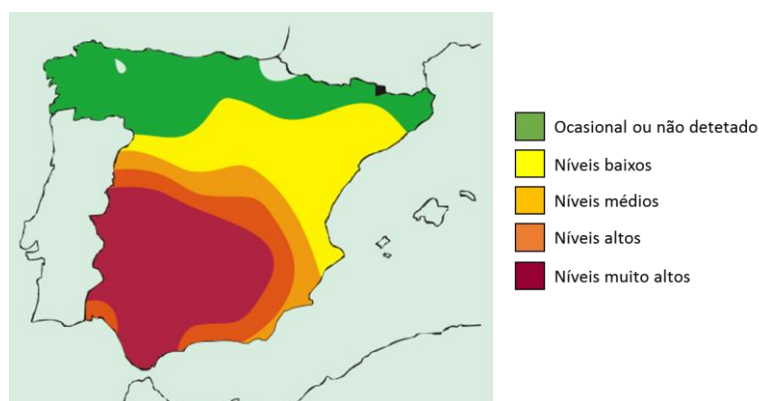


FIGURA 2 - Distribuição geográfica do pólen em Espanha. Adaptado de Gutiérrez, 2011

1.1.2. CARACTERIZAÇÃO DO CONTEÚDO EM ALERGÊNIOS DO PÓLEN

O pólen da oliveira (Figura 3) apresenta as condições adequadas para ser alergénico: é pequeno ($\approx 18\mu\text{m}$), propaga-se pelo ar e as contagens polínicas diárias em muitas áreas chegam a ultrapassar $5000\text{ grãos}/\text{m}^3$, mantendo esses níveis durante semanas (Villalba, Rodríguez, & Batanero, 2014).



FIGURA 3 - Imagem do pólen de *Olea europaea* obtida por microscopia ótica. Os grãos de pólen foram corados com fucsina básica para observação (ampliação 100X). (Adaptado de SMITH, 2000).

No que diz respeito aos agentes causadores da resposta alérgica pelo pólen de oliveira – os alergénios – muitos já foram isolados e caracterizados. O alergénio *major*, ou seja, o primeiro que a ser identificado, denomina-se *Ole e 1* e o seu conteúdo em extrato de pólen de oliveira está diretamente relacionado com a atividade alérgica do extrato. Para além deste alergénio, encontram-se identificados outros doze – *Ole e 2* a *Ole e 13*. As características de cada um encontram-se resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características dos diferentes alergénios de *Olea europaea*

| Alergénio | Massa Molecular | Características Bioquímicas | Frequência de ligação a IgE entre pacientes afetados | Outras características |
|----------------|---|--|--|---|
| <i>Ole e 1</i> | <ul style="list-style-type: none"> forma glicosilada – 20kDa; forma não glicosilada – 19kDa | <ul style="list-style-type: none"> cadeia polipeptídica de 145 resíduos de aminoácidos proteína ácida 4 epítomos para os linfócitos B; Muito solúvel em soluções salinas pl = 5,5; 5,9; 6,6 | $\approx 80\%$ (González, et al., 2006) | <ul style="list-style-type: none"> Grau de similaridade de sequência com proteínas homólogas entre membros da mesma família (lilás, ligustro, freixo) (Twaroch, et al., 2011) Parece estar envolvido na hidratação do pólen e nos processos de germinação (Villalba, Rodríguez, & Batanero, 2014) |
| <i>Ole e 2</i> | 15kDa | <ul style="list-style-type: none"> Profilina pl = 5,1 | $\approx 24\%$ (Cárdaba, et al., 2000) | |
| <i>Ole e 3</i> | 9,2kDa | <ul style="list-style-type: none"> denominada também polcalcina dois sítios de ligação a Cálcio (Rodríguez R. , Villalba, Batanero, Palomares, & Salamanca, 2007) pl = 4,2 e 4,3 | | |
| <i>Ole e 4</i> | 32kDa | <ul style="list-style-type: none"> superoxidodismutase (SOD) (Rodríguez R. , Villalba, Batanero, Palomares, & Salamanca, 2007) pl = 4,6 e 5,1 2 isoformas | $\approx 80\%$ (Cárdaba, et al., 2000) | <ul style="list-style-type: none"> sem homologia com outras proteínas conhecidas maior grau de polimorfismo que <i>Ole e 5</i> |
| <i>Ole e 5</i> | 16kDa | <ul style="list-style-type: none"> Cu/Zn SOD (Villalba, Rodríguez, & Batanero, 2014) pl = 5,1 e 6,5 (similar a <i>Ole e 1</i>) 5 isoformas | $\approx 35\%$ (Cárdaba, et al., 2000) | <ul style="list-style-type: none"> Alto grau de homologia com SOD de plantas (Cárdaba, et al., 2000) |
| <i>Ole e 6</i> | 10kDa | <ul style="list-style-type: none"> Rico em cisteína (Carnés & Fernández-Caldas, 2002) pl = 4,2 | | |

| | | | | |
|-----------------|--|--|---|--|
| Ole e 7 | 9,8kDa e 10,3kDa | <ul style="list-style-type: none"> LTP – proteínas de transporte de lípidos. pl > 9 | | <ul style="list-style-type: none"> Alto grau de polimorfismo Sem homologia com outras proteínas |
| Ole e 8 | 21kDa | <ul style="list-style-type: none"> Capacidade ligação a cálcio (Carnés & Fernández-Caldas, 2002) pl = 4,5 | ≈ 10% (Villalba, Rodríguez, & Batanero, 2014) | |
| Ole e 9 | 45kDa 2 domínios: • N terminal – 36kDa • C terminal – 10kDa | <ul style="list-style-type: none"> 1,3-β-glucanase (Rodríguez R., Villalba, Batanero, Palomares, & Salamanca, 2007) N terminal: sítio ativo e atividade catalítica para hidrolisar 1,3-β-glucanos C terminal: capacidade ligação a hidratos de carbono pl = 4,8; 4,9; 5,1; 5,4 | ≈ 65% (Carnés & Fernández-Caldas, 2002) | <ul style="list-style-type: none"> Baixo mas significante polimorfismo Domínio C terminal é homólogo a <i>Ole e 10</i> (53% identidade, 69% similaridade) (Rodríguez R., Villalba, Batanero, Palomares, & Salamanca, 2007) Pode ser considerado alergénio <i>major</i> (Rodríguez R., et al., 2002) |
| Ole e 10 | 10,8kDa | <ul style="list-style-type: none"> Liga-se a laminarina, ao polissacárido de 1,3-β-glucose pl = 5,8 | ≈ 54% (Rodríguez R., et al., 2002) | <ul style="list-style-type: none"> Partilha epitopos com outras espécies (de <i>Oleaceae</i>, <i>Graminae</i>, <i>Betulaceae</i>, <i>Chenopodiaceae</i>, <i>Cupressaceae</i>, <i>Parietaria</i> e ainda com latex, e alimentos derivados de plantas. (Rodríguez R., et al., 2002) |
| Ole e 11 | 39,65kDa | <ul style="list-style-type: none"> Pectina metilesterase (Villalba, Rodríguez, & Batanero, 2014) pl = 6,3 – 9,3 | | |
| Ole e 12 | | <ul style="list-style-type: none"> Isoflavina redutase (Villalba, Rodríguez, & Batanero, 2014) pl = 4,8 – 5,7 | ≈ 10%, chegando aos 25% quando associado a alergia ao pêssego (Villalba, Rodríguez, & Batanero, 2014) | |
| Ole e 13 | 23kDa | <ul style="list-style-type: none"> proteína da família das taumatinas pl = 4,3 ; 4,8 | | |

Depois da descoberta do alergénio *major*, a identificação e isolamento dos restantes demorou quase dez anos, o que se deveu ao facto do elevado número de bandas reativas a IgE no extrato de pólen, como se pode observar na Figura 4. Nesta figura é possível identificar a presença do alergénio *Ole e 1*, com massa molecular aproximadamente de 20kDa. Muitas bandas que surgem nos registos de imunoblot obtidos após separação por SDS-PAGE correspondem ao mesmo alergénio, devido ao seu carácter polimórfico. Outros, com massas moleculares mais elevadas (40 a 70kDa) ainda não estão caracterizados e a sua prevalência ainda não foi analisada, exceto a banda correspondente a *Ole e 9* (46kDa).

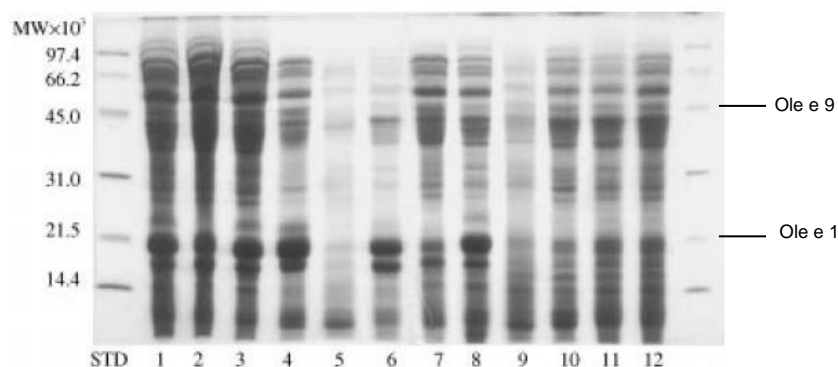


FIGURA 4 - SDS-PAGE de doze lotes diferentes de *Olea europaea*. As lanes de 1 a 6 correspondem a pólen proveniente da Espanha enquanto os restantes correspondem a pólen colhido nos EUA. (Adaptado de CARNÉS & FERNÁNDEZ-CALDAS, 2002)

A prevalência do reconhecimento de alergénios entre a população alérgica ao pólen da oliveira depende de vários fatores como a população, o extrato de pólen usado e, muito importante, a área geográfica. A sensibilização aos alergénios *Ole e 6*, *Ole e 7*, *Ole e 9* e *Ole e 10* depende muito da área geográfica, podendo a prevalência ser superior a 50% em locais com elevados níveis de pólen. Em Espanha, por exemplo, no que diz respeito aos alergénios *Ole e 7* e *Ole e 9* a sua prevalência é menor que 10% em zonas onde o nível de pólen libertado é baixo, como em cidades

do interior do país (Madrid e Navarra). Contudo, em locais onde as contagens polínicas atingem os 5000/m³ a sensibilização a estes dois alergénios torna-se altamente prevalentes na população, podendo chegar aos 60% (Villalba, Rodríguez, & Batanero, 2014) (Rodríguez R. , Villalba, Batanero, Palomares, & Salamanca, 2007).

A prevalência da sensibilização em Portugal não está ainda bem estudada, havendo apenas estudos de sensibilização envolvendo maioritariamente grupos de crianças. Um estudo feito no Hospital do Espírito Santo em Évora, com 868 crianças, no período entre janeiro de 2002 e junho de 2005 revelou que 34% das crianças se mostraram sensibilizadas a *Olea* (Diamantino, Caeiro, Martins, Almeida, & Lopes, 2006). A zona da Cova da Beira foi a mais estudada até agora. Outro estudo com 371 pacientes pediátricos verificou que 27,5% dos mesmos eram sensíveis a *Olea* (Loureiro, et al., 2005); enquanto que um estudo em que tinha como objetivo verificar as diferenças entre zonas rurais e urbanas permitiu concluir que para o caso do alergénio em estudo não há diferenças significativas já que, em 1096 pacientes estudados, no período de 1995-2000, dos que viviam na zona rural 23,3% eram sensíveis a *Olea* e na zona urbana 30,2% (Lourenço, Fonseca, & Taborda-Barata, 2007). Um estudo realização em Córdoba e Évora permitiu verificar que dos 15 pacientes estudados em Córdoba, 86,6% era sensível a *Olea* e dos 27 pacientes de Évora, 39,2% apresentavam sintomas com os alergénios da oliveira (Sánchez Mesa, Brandao, Lopes, & Galan, 2005). Todos estes estudos foram realizados através da realização do teste de Prick.

Uma das características deste pólen é a sua variabilidade. Demonstrou-se que, de diferentes cultivares, são produzidos pólenes com diferentes características alérgicas. Assim, tem vindo a ser sugerido que a alergenidade do pólen de oliveira pode depender da variedade da oliveira, o que pode ter importantes consequências do ponto de vista alergológico. Como diferentes variedades podem produzir pólen com grande variabilidade no que respeita ao conteúdo em alergénios (Carnés & Fernández-Caldas, 2002), é de esperar que a resposta alérgica depois da inalação ao pólen de oliveira seja variável, dependendo da variedade do pólen inalado. De facto, sendo a monitorização dependente das contagens polínicas, é expectável que, em diferentes regiões, dependendo das variedades existentes, a quantidade de pólen necessária para induzir sensibilização e sintomas nos doentes atópicos seja variável (Carnés & Fernández-Caldas, 2002).

1.2. ALERGIA – REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO I

O sistema imunitário possui um sistema de defesa capaz de distinguir o que pertence ao organismo (*self*) do que é estranho ou seja, que não é produzido pelo mesmo e vem de fora (*non-self*). Este sistema responde e destrói as substâncias invasoras que podem causar doença. Contudo, o nível de resposta e, conseqüentemente, a severidade da mesma, a substâncias invasoras é dependente do sistema imunitário de cada indivíduo. Quer seja um vírus, uma bactéria ou apenas pólen, qualquer material que não seja produzido pelo organismo e que desencadeia uma resposta imunitária é denominado de antígeno e, no caso particular de desencadear uma resposta alérgica, alergénio.

De acordo com a EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology), a alergia é uma “reação de hipersensibilidade iniciada por mecanismos imunológicos” (Rosado Pinto, José, 2004). Esta reação de hipersensibilidade, denominada de tipo I, é desencadeado por alergénios, moléculas presentes no ambiente, que, só por si, em indivíduos saudáveis, não desencadeiam resposta alérgica. A alergia parece resultar de uma condição do sistema imunitário, comumente designada de atopia. A EAACI define que a hipersensibilidade “causa sinais ou sintomas objetivamente reprodutíveis, iniciados pela exposição a um estímulo definido, tolerado pelos indivíduos normais”. Em indivíduos atópicos, o sistema imunitário reage inapropriadamente a alergénios, resultando no desenvolvimento da doença alérgica inflamatória onde se incluem a asma alérgica, a rinoconjutivite e a dermatite atópica ou o eczema atópico (Knox & SupNegiu, 1996).

A alergia pode ser mediada por anticorpos ou por células. A resposta celular envolve a produção de linfócitos que são capazes de se ligar e destruir o antígeno. Na grande maioria dos casos, o anticorpo responsável pela reação alérgica é a IgE, importante na libertação de mediadores inflamatórios, que irão ser referidos mais tarde. As respostas retardadas, mediadas por células, denominadas reações de hipersensibilidade do tipo I, já que se desenvolvem lentamente, demorando um a quatro dias a chegar ao pico da resposta. As que são mediadas por anticorpos são denominadas de imediatas pois os sintomas surgem de minutos a umas horas após o contacto com a fonte alérgica.

As reações de hipersensibilidade do tipo I são um processo que se desenvolve em duas etapas (Figura 5):

1. A primeira, exposição ao alergénio, em que o sistema imunitário produz imunoglobulinas específicas (IgE) e IgG que migram e se vão ligar à superfície dos mastócitos e basófilos, nas mucosas – fase de sensibilização;
2. Na segunda e seguintes exposições, os alergénios ligam-se às IgE específicas presentes na superfície dos mastócitos e basófilos, libertando os mediadores da resposta alérgica, como a histamina, que provoca os sintomas nos pacientes atópicos – fase efetora.

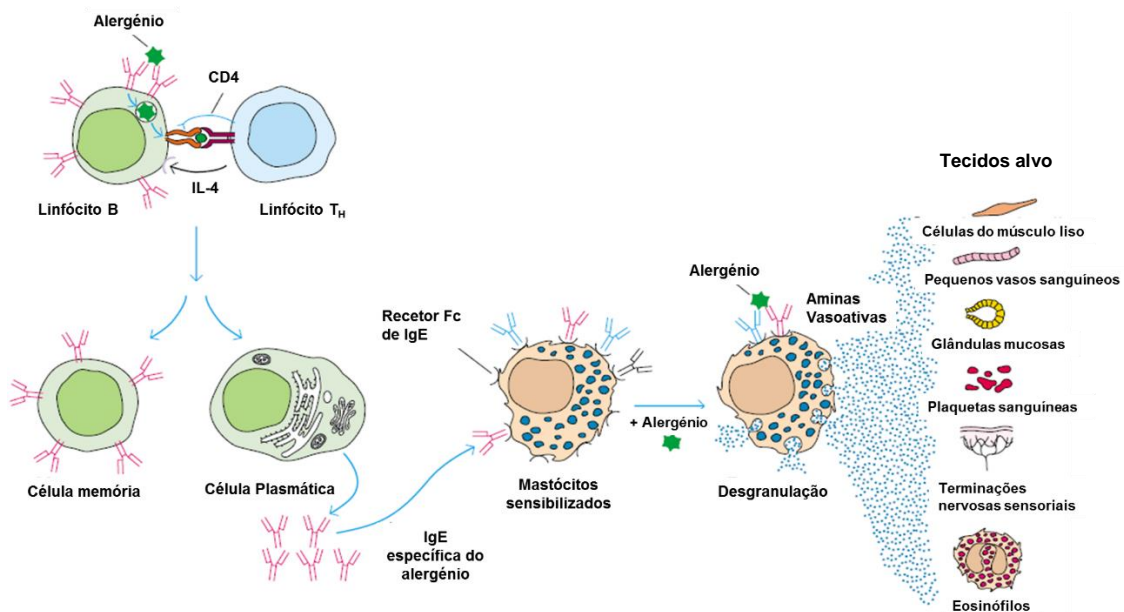


FIGURA 5 - Mecanismo geral da reação de hipersensibilidade do tipo I. Adaptado de (KINDT, OSBORNE, & GOLDSBY, 2006)

De modo a entender melhor como este processo ocorre, é necessário compreender o papel de cada célula envolvida e todos os seus produtos, bem como a regulação efetuada pelo sistema imunitário durante este processo tão importante e que ainda não se encontra totalmente esclarecido. Nos pontos seguintes, descrever-se-ão, de um modo resumido, as células e os produtos das mesmas que estão envolvidos na reação alérgica.

1.2.1. FASE DE SENSIBILIZAÇÃO

Nesta fase dá-se o desenvolvimento de células memória T e B e a produção de IgE. As células efectoras T-helper tipo 2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13 (Figura 6). A primeira e a última induzem mudança de classe na cadeia pesada da imunoglobulina ϵ nos linfócitos B e a produção de anticorpos IgE específicos ao antígeno. A IgE específica do alérgénio liga-se ao recetor de alta afinidade Fc ϵ RI na superfície dos mastócitos e basófilos, ao que se denomina a sensibilização do paciente. (Larché, *et al.*, 2006)

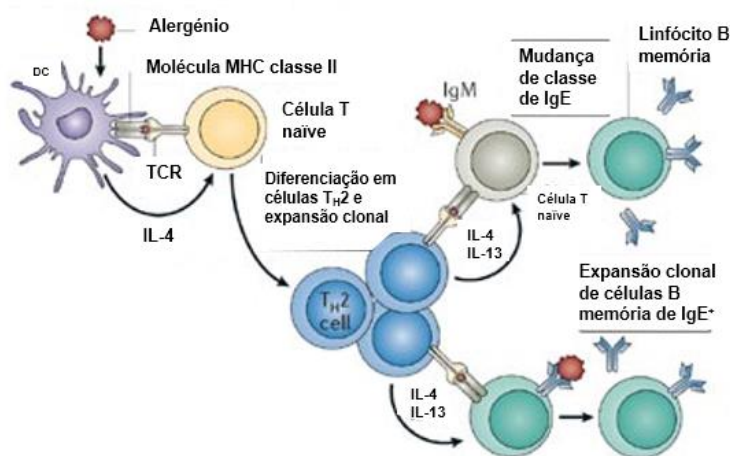


FIGURA 6 - Mecanismos envolvidos na fase de sensibilização da reação de hipersensibilidade do tipo I. Adaptado de (LARCHÉ, AKDIS, & VALENTA, 2006)

1.2.1.1. CÉLULAS DENDRÍTICAS E CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTIGÉNIOS (APC)

As células dendríticas são as primeiras células do sistema imunitário a ter contacto com os alérgénios, na superfície das mucosas, chegando aos antígenos diretamente pela extensão das dendrites, através da barreira epitelial. Nos nodos linfáticos, estas células enviam o sinal do tipo de antígeno encontrado, induzindo a diferenciação de células T-helper CD4 e a ativação de células T CD8, enviando a informação aos linfócitos B.

As células apresentadoras de antígenos (APCs) capturam e processam o antígeno, apresentando os fragmentos na sua superfície celular. Estas migram para as zonas do tecido linfóide e apresentam os antígenos às células efectoras e moduladoras do sistema imunitário (linfócitos T, B e células NK).

Estas células, juntamente com as moléculas que expressam nas suas membranas plasmáticas e as citocinas, são as responsáveis pela ativação específica da resposta imunitária.

1.2.1.2. LINFÓCITOS T

Tanto a resposta imunitária inata como a adquirida são mediadas por linfócitos T, os quais reconhecem estruturas imunogénicas pelo recetor de linfócitos T (TCR). A ativação e diferenciação destas células são integradas por múltiplos sinais dos tecidos, do sistema imunitário e pelo ambiente. Para que tal aconteça, é necessário que a molécula do alergénio possua uma região específica (epítopo) para ativação dos linfócitos T. Os epítopos podem ser assim regiões internas da molécula do alergénio pois esta é fragmentada durante o seu processamento inicial pelas APCs.

Os linfócitos T ativados vão-se dividir e depois do término de uma resposta imunitária algumas células (de memória) vão permanecer na circulação sanguínea. Estas células estão capazes de rapidamente se expandir e reproduzir uma resposta imunitária, quando necessário.

A ativação do linfócito T é então dependente do processamento e apresentação dos alergénios pelas APCs, onde se incluem linfócitos B, células dendríticas e monócitos/macrófagos. Quando uma célula Th é ativada pela apresentação de um antígeno, será determinada qual ou quais mecanismos que serão ativados, nomeadamente, a ativação de células TCD8+ citotóxicas (Tc) ou ativação de mastócitos e eosinófilos, por exemplo. Existem duas subpopulações de linfócitos Th importantes na resposta alérgica: as Th1 e as Th2, que produzem diferentes tipos de citocinas e modulam os vários tipos de cooperação celular. Provenientes da mesma célula progenitora, as células Th1 segregam interleucina 2 (IL-2), Interferão- γ (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e IL-12, enquanto as células Th2 são capazes de segregar as citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Kindt, *et al.*, 2006). A via de ativação vai depender de que subpopulação de linfócitos T (Th1 ou Th2) vai ser ativada, e isto depende das citocinas e outros metabolitos presentes no tecido linfóide.

As células T regulatórias (Treg) têm um papel importante em doenças autoimunes e em casos de rejeição de transplantes contudo, também parecem ter um papel de relevância no controlo da alergia e asma apesar de ainda ser um assunto em estudo. Estudos recentes sugerem que diversas populações de Treg são importantes na regulação da resposta aos alergénios pelos linfócitos Th2. Em modelos experimentais as Treg podem suprimir a resposta por parte dos linfócitos Th2 ao alergénio, a hipersecreção do muco e a resposta exagerada das vias aéreas. Sabe-se que as células Treg CD4⁺ inibem funções efetoras dos linfócitos Th1 e Th2. (Larché M. , 2007)

1.2.1.3. CÉLULAS NATURAL KILLER (NK)

Nas reações de hipersensibilidade do tipo I estas células regulam a produção de células Th1 e Th2 específicas ao alergénio, bem como a indução e supressão de IgE.

Estas células podem-se dividir em quatro diferentes subgrupos, de acordo com a secreção de interleucinas. As células que crescem com IL-12 e IL-18 (NK1) produzem IFN- γ e inibem a produção de IgE, enquanto as que crescem com IL-4 (NK2) produzem IL-5 e IL-13, estimulando a produção de IgE. Ainda existem as NKreg, que produzem IL-10 e TGF- β , suprimindo a produção de IgE e as NK22, que segregam IL-22 e diz-se terem um efeito protetor nas barreiras das células epiteliais. (Kindt, *et al.*, 2006)

1.2.1.4. LINFÓCITOS B

Cruciais nas doenças alérgicas pela produção de anticorpos IgE específicos, os linfócitos B são necessários para uma resposta imune, sendo também estimuladas para proliferar em clones pelas citocinas (interleucinas), produzidas pelos linfócitos T.

A produção de IgE pelos linfócitos B incluiu uma troca de classes na cadeia pesada da imunoglobulina IgE (C ϵ). As células Th2 CD4+ que produzem IL-4 e expressam CD40L são responsáveis pela diferenciação das células B em IgE. A produção de IgE é, então, dependente das IL-4 e IL-3. (Kindt, *et al.*, 2006)

Os linfócitos B de regulação (B_{reg}) também se têm mostrado importantes para inibir a subativação de repostas imunes, na medida em que produzem citoquinas regulatórias negativas, como IL-10 e TGF- β , já referidas anteriormente. (Kindt, *et al.*, 2006)

Dependendo da IL libertada no processo de ativação do linfócito B assim se vai dar a produção de IgG (estimulada por Th1: IL-1, IFN- γ , IL-12) ou IgE (estimulada por Th2: IL-4,IL-6).

1.2.1.5. AS INTERLEUCINAS

As citocinas atuam como mensageiros do sistema imunitário. São proteínas solúveis ou péptidos. Há vários grupos de citocinas envolvidas e responsáveis pela sensibilização a um alérgico bem como na mediação da inflamação alérgica.

Existem quatro tipos distintos de citocinas: os interferões (IFN) que interferem na replicação de vírus, os fatores de estimulação de colónias (CSF) que suportam o crescimento e diferenciação vários elementos na medula óssea, os fatores de necrose tumorais (TNF) que estão envolvidos na necrose hemorrágica de tumores e, por último, o grande grupo de interleucinas que têm como principal função fazer a comunicação entre várias populações de linfócitos. Nas alergias várias citocinas estão envolvidas; a IL-4 causa a mudança dos linfócitos B em IgE, o IFN- γ pode inibir esta troca e prevenir a produção de IgE específica e a IL-10 pode inibir o IFN- γ , permitindo que o IL-4 produza assim as IgE's específicas. A resposta alérgica pode ser vista como uma produção excessiva de IL-4 e IL-10, uma deficiência de produção de IFN- γ ou ambos. (Kindt, Osborne, & Goldsby, 2006)

1.2.1.6. OS ANTICORPOS

Os anticorpos humanos estão agrupados em cinco classes distintas (imunoglobulinas A, D, E, G e M), de acordo com as suas funções biológicas, sendo que o sistema imunitário pode produzir todas estas classes em resposta a uma substância invasora. Contudo, não há sintomas alérgicos sem a produção da imunoglobulina E (IgE). Importante referir que existem ainda quatro subclasses de IgG (IgG1-4) e duas de IgA (IgA1-2), para além das cinco classes principais. (Kindt, *et al.*, 2006)

Nos anos 60, K. e T. Ishizaka publicaram vários artigos onde descreviam um anti-soro que podia bloquear o SKP teste, referindo-se a este como anti- γ E. Em 1965, S.G.O. Johansson detetou, no soro de um paciente com mieloma, um componente não identificado. Em conjunto com H. Bennich realizaram estudos imunológicos, encontrando assim uma imunoglobulina a que denominaram de IgND. Em 1967, a imunoglobulina purificada foi enviada para Ishizaka e descobriu-se que apresentava similaridade com a anti- γ E. Um ano depois uma publicação com a colaboração

dos dois grupos determinou-se assim que se tinha descoberto uma nova imunoglobulina, a IgE. (Ishizaka & Ishizaka, 1967; Bennich, et al, 1968; Stanworth, et al, 1967)

Esta classe de anticorpos foi a última a ser descoberta porque é normalmente produzida em pequenas quantidades. A concentração de todos os anticorpos no soro de um indivíduo não alérgico é cerca de 15mg/mL mas a concentração de anticorpos IgE é apenas de 0.0001 mg/mL. Os indivíduos alérgicos, contudo, tendem a apresentar concentrações elevadas de anticorpos IgE. (Goldstein & Dembo, 1982)

Os anticorpos são constituídos por unidades em forma de “Y” (Figura 7). Cada unidade contém duas idênticas cadeias polipeptídicas pesadas cuja massa molecular depende do anticorpo, variando entre os 55.000 e os 75.000 Daltons. As cadeias pesadas são ligadas por uma ou mais ligações dissulfureto para formar a base do Y, denominada região Fc. As porções das cadeias que não ficam ligadas, são livres e constituem os braços flexíveis do Y, denominando-se, em cada um deles, domínio Fab. Cada Fab contém uma cadeia polipeptídica leve que se junta à cadeia pesada por ligações dissulfureto. Estas cadeias também são idênticas e têm uma massa molecular de cerca de 23.000 Daltons. Os anticorpos IgE são monómeros, consistindo apenas numa destas formas Y.

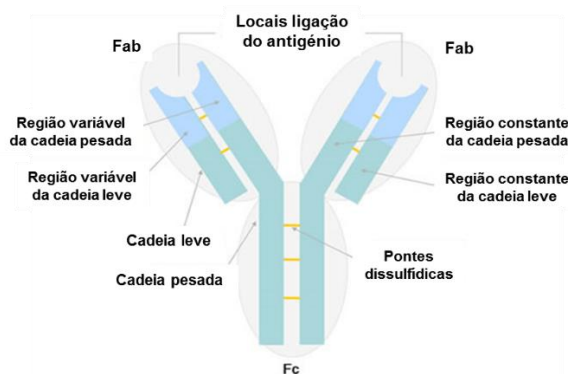


FIGURA 7 – Esquema simplificado representando a estrutura do anticorpo (adaptado de (PROTEINTECH, 2015))

É a região Fc que interage com as células e recetores no organismo e, por isso, determina as funções biológicas dos anticorpos. O sítio de ligação a antígenos está localizado no final das regiões Fab (fragmento de ligação ao antígeno). É nesta região que é determinada a especificidade do anticorpo. Os anticorpos da mesma classe mas específicos a diferentes antígenos são idênticos nas suas regiões Fc e diferem nas regiões Fab. (Kindt, *et al.*, 2006)

1.2.2. FASE EFETORA – REAÇÃO IMEDIATA

Nesta fase, quando um novo contacto com o alérgico ocorre, este liga-se ao complexo IgE-FcεRI nos basófilos e mastócitos sensibilizados, estes são ativados e conseqüentemente, ocorre a libertação de mediadores que são responsáveis pelas reações de hipersensibilidade imediata e pelos respetivos sintomas.

1.2.2.1. RECETOR DE ALTA AFINIDADE PARA A IGE: FcεRI

Hoje em dia sabe-se que nem só os mastócitos e basófilos expressam este recetor. Existem evidências da presença do FcεRI nas células de Langerhans, monócitos e células derivadas destas, eosinófilos e neutrófilos.

O FcεRI é composto por três subunidades: α, β e γ. Quando todas as subunidades se encontram presentes, o recetor é expresso com uma unidade α, uma β e duas unidades γ, ligadas por pontes dissulfureto. A cadeia α é responsável pela ligação à IgE, onde existem dois locais de ligação. As cadeiras β e γ contêm ITAMs (motivo de ativação de imunorecetor baseado em tirosina) que medeiam a interação com cinases (Figura 8). A subunidade β não tem necessariamente que estar presente para o recetor se encontrar expresso e realizar a sua função, contudo, para existir uma forte expressão do recetor, a presença desta cadeia é muito importante, tal como a concentração de anticorpos IgE circulantes (MacGlashan, JR., 2005).

Os ITAM's interagem com proteínas tirosina-cinase para transdução e ativação de sinal à célula. A ligação com IgE resulta numa agregação dos recetores FcεRI e, conseqüentemente, numa rápida fosforilação da tirosina, que inicia o processo de desgranulação dos mastócitos e basófilos. (Kindt, Osborne, & Goldsby, 2006)

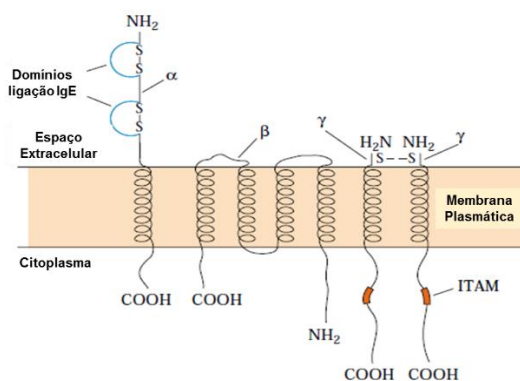


Figura 8 - Representação esquemática do recetor de alta afinidade para a IgE, FcεRI (KINDT, OSBORNE, & GOLDSBY, 2006)

Apesar de a IgE ter um tempo de semi-vida no organismo de alguns dias, os mastócitos e basófilos permanecem sensibilizados para a IgE durante meses, devido à alta afinidade que a IgE apresenta para o recetor FcεRI, o que evita que a IgE seja destruída por proteases séricas.

As células também apresentam um recetor de Fc, denominado de FcεRII, contudo, este apresenta baixa afinidade pela IgE.

1.2.2.2. MASTÓCITOS

Os mastócitos estão presentes em todos os tecidos, muitas vezes perto das superfícies epiteliais, como a pele, sistema respiratório e trato gastrointestinal; bem como próximo de canais sanguíneos, nervos, células do músculo liso e fibroblastos.

Os precursores dos mastócitos são gerados na medula óssea, circulam no sangue e entram nos tecidos onde sofrem a sua completa maturação, tornando-se células com numerosos grânulos citoplasmáticos proeminentes. Estes grânulos são o local onde estão guardados os produtos dos mastócitos, denominados mediadores e que, quando libertados pelas células, têm poderosos efeitos nos outros tipos de células. (Kindt, *et al.*, 2006)

Os grânulos dos mastócitos contêm a maior parte da histamina, heparina e proteases do corpo humano. Aquando da desgranulação, eles também libertam outros mediadores que não estão armazenados mas que são sintetizados pelas células ativadas, incluindo leucotrienos, prostaglandinas, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Tabela 2).

Tabela 2 - Produtos dos mastócitos e efeitos biológicos. Adaptado de (AKDIS & AGACHE, 2014)

| | Produtos | Efeitos Biológicos |
|---|--|--|
| <i>Guardados nos grânulos e secretados quando há ativação (em minutos)</i> | Histamina | <ul style="list-style-type: none"> • Aumenta permeabilidade vascular e dilatação dos vasos sanguíneos; • Contração das vias respiratórias do músculo liso; • Causa irritação e dor; • Influencia resposta imune e função de alguns nervos; |
| | Heparina | <ul style="list-style-type: none"> • Anticoagulante; |
| <i>Sintetizados e secretados sob ativação (começa em minutos para os mediadores lipídicos e estende-se por horas para os produtos peptídicos)</i> | Proteases (tripsina, etc.) | <ul style="list-style-type: none"> • Degrada certas proteínas e péptidos; • Regula remodelação dos tecidos |
| | Mediadores lipídicos (leucotrienos, prostaglandinas, etc.) | <ul style="list-style-type: none"> • Regula migração e função dos leucócitos; • Aumenta permeabilidade vascular • Induz contração ou dilatação das veias sanguíneas (depende do tipo de mediador) • Responsável pela contração e relaxação do músculo liso • Aumenta secreção do muco |
| | Citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento de péptidos | <ul style="list-style-type: none"> • Efeitos noutras células que podem promover ou suprimir inflamação e/ou remodelação dos tecidos |

Estas células expressam na sua superfície centenas ou até milhares de recetores de alta afinidade da IgE (FcεRI), que se ligam fortemente à porção Fc destes anticorpos, denominados Fcε, em que o épsilon indica a especificidade para os anticorpos do isotipo E. O número de recetores varia muito, sendo que pacientes alérgicos tendem a possuir um número mais elevado. Cada mastócito pode ligar-se a IgE's que reconhecem uma variedade de diferentes alergénios. Estes mastócitos podem ser ativados quando eles encontram antigénios que se ligam, por epítomos distintos, com duas moléculas de IgE adjacentes (Figura 9), o que resulta numa “malha” de ligações IgE-FcεRI, sinalizando as células a libertar os seus produtos. Os mastócitos também podem ser ativados por produtos de microrganismos, certos neuropéptidos e compostos presentes em venenos de animais.

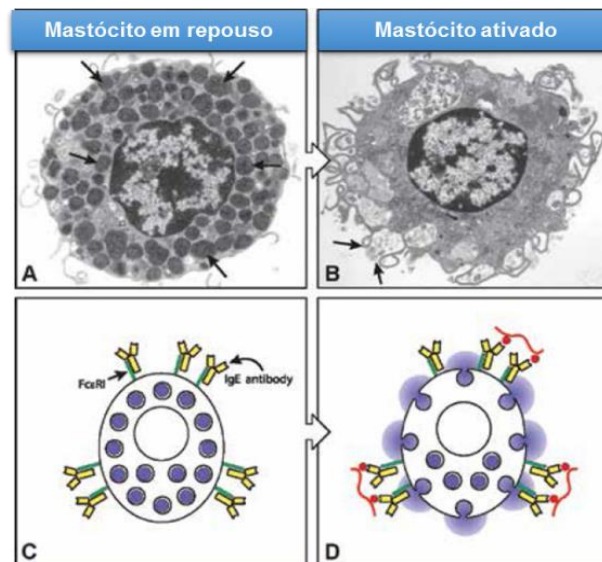


Figura 9 – Ativação dos mastócitos por alergénios. A e C: mastócito em repouso (A - imagem de um mastócito por microscopia de transmissão eletrónica, C - imagem representativa do mastócito com o recetor de alta afinidade para a IgE, a verde, e o anticorpo IgE, a amarelo, contendo vários grânulos citoplasmáticos). Quando um alergénio (a vermelho) é reconhecido pelos anticorpos, estes ligam-se ao complexo recetor FcεRI-IgE, na superfície dos mastócitos, libertando para fora da célula o conteúdo dos grânulos, como se observa na imagem por microscopia eletrónica (B) e pela imagem representativa (D). Adaptado de (AKDIS & AGACHE, 2014)

1.2.2.3. BASÓFILOS

Os basófilos partilham certas características com os mastócitos, incluindo a presença de grânulos no citoplasma, a expressão na superfície do recetor de IgE e a libertação de mediadores

em resposta a vários estímulos. Contudo, estes foram muitas vezes considerados como *minor* e redundantes ou percussores de mastócitos quando presentes em comum nos tecidos. De facto, em certas situações clínicas, os basófilos têm sido usados como substitutos dos mastócitos em tecidos onde estes estão menos acessíveis, bem como para a quantificação *in vitro* da resposta imediata a alergénios em pacientes alérgicos (Akdis & Agache, 2014).

Os basófilos circulam no sangue periférico e estão raramente presentes nos tecidos periféricos sob condições homeostáticas, ao contrário dos mastócitos. O tempo de semi-vida dos basófilos circulantes é estimado em dois dias, enquanto os mastócitos vivem por meses nos tecidos periféricos. Embora estas diferenças sugiram que os mastócitos e basófilos possam ter um papel distinto *in vivo*, não há evidências que o provem (Akdis & Agache, 2014).

1.2.3. A LIGAÇÃO ESPECÍFICA ANTIGÉNIO-ANTICORPO

O modelo tradicional usado há alguns anos sugeria que o antigénio se ligava ao anticorpo por um modelo tipo chave-fechadura, contudo, hoje em dia, já se sabe que a interação que ocorre envolve locais combinatórios, sendo estabilizada por ligações não covalentes, onde os grupos que interagem devem estar próximos para que estas forças atuem ou seja, devemos ter uma complementaridade entre o epítopo antigénico e o anticorpo. As variações que ocorrem nesta complementaridade, é que geram diferenças na afinidade, avidéz e especificidade do anticorpo. (Kindt, Osborne, & Goldsby, 2006)

1.2.3.1. Reatividade cruzada dos alergénios de *Olea europaea*

A reatividade cruzada é baseada no reconhecimento imunológico. Dois alergénios apresentam reatividade cruzada se existir um anticorpo (ou recetor de linfócito T) que reaja com ambos. Para existir reatividade cruzada entre alergénios é necessário que estes possuam uma estrutura similar, o que, para estas proteínas, requer também uma similaridade no “*fold*ing”, por serem globulares. A homologia entre duas proteínas, limitada a uma pequena sequência de aminoácidos é pouco provável que resulte em uma reatividade cruzada significativa, a não ser que exista uma similaridade entre o “*fold*ing” das suas estruturas 3D (Aalberse, Akkerdaas, & van Ree, 2011).

Atualmente, ainda não se conhecem todos os mecanismos envolvidos e que permitirão entender melhor como funciona a reatividade cruzada entre alergénios, em termos moleculares.

A reatividade cruzada em plantas depende de duas principais premissas: a primeira é que, quanto mais relacionadas as plantas são, mais antigénios têm em comum; a segunda é que, a classificação botânica aceite, de facto, reflete a filogenia. Em plantas do mesmo género é esperado que tenham elevado número de alergénios partilhados, da mesma família, talvez alguns diminuindo significativamente em plantas distantemente relacionadas. Com algumas exceções, que se devem à presença de panalergénios, designadamente as profilinas e as proteínas de ligação de cálcio, esta abordagem tem sido validada. As profilinas são pequenas (12-15kDa) e têm sido bem preservadas ao longo da evolução. Encontram-se em quase todos os organismos já que estão presentes em várias vias de interações moleculares. As profilinas do pólen são altamente reativas e representam

cerca de 10-30% da resposta da IgE em pacientes alérgicos. (Tavares, Machado, Loureiro, Cemlyn-Jones, & Pereira, 2008)

Assim, as reações cruzadas entre alergénios presentes na mesma família ou, até, famílias diferentes são naturais e cada vez mais se identificam casos de pacientes atópicos com um elevado nível de reatividade cruzada com várias espécies, o que se denomina de polisensibilização. Na população da área mediterrânica que sofre polinose é uma característica geral, já que a coexistência de muitas árvores, espécies de ervas, gramíneas e alergénios *minor* nos extratos resulta num diagnóstico complexo e muitas vezes numa imunoterapia específica sem sucesso (Villalba, Rodríguez, & Batanero, 2014).

A identificação de sequências aminoacídicas entre homólogos de *Ole e 1* na família *Oleaceae* é maior que 80%, sendo estas as principais responsáveis pela forte reatividade cruzada que estes pólenes apresentam. Os pacientes alérgicos a *Ole e 1* podem sofrer sintomas quando expostos a lilás, ligustro e freixo; apesar de estes não estarem classificados como alergénicos. Contudo, possuem proteínas homólogas de *Ole e 1* com sequências altamente conservadas. (Villalba, Rodríguez, & Batanero, 2014)

Para além de espécies da mesma família, o pólen da oliveira também apresenta uma forte reatividade cruzada com a família *Poaceae* (Rodríguez R. , et al., 2002) devido às profilinas em comum. Recentemente, descobriu-se reatividade cruzada com *Eleagnus angustifolia*, árvore pertencente à família *Eleagnaceae* e relativamente relacionada com a oliveira (Weber, 2003).

1.2.4. LIBERTAÇÃO DE MEDIADORES E REAÇÃO INFLAMATÓRIA

A ligação antigénio-anticorpo não é uma ligação simples, já que o alergénio tem que se ligar a duas moléculas de anticorpo para se dar a reação, ou seja, o antigénio deve ter mais do que um local de ligação para permitir criar esta matriz antigénio-anticorpo, como já foi referido anteriormente (secção 1.2.2.2.). Sempre que se dá esta ligação um canal Ca^{2+} abre-se, os iões atravessam a membrana celular e o influxo destes desencadeia a fusão dos grânulos com a membrana e estes libertam o seu conteúdo de histamina e outros mediadores para o exterior (Goldstein & Dembo, 1982). Contudo, já foi demonstrado que é possível existir libertação de histamina mesmo sem haver sensibilização dos mastócitos ou basófilos, ou seja, sem haver ligação antigénio-anticorpo. O processo pode ocorrer se houver a ligação cruzada de lectinas (como a concavalina A), fatores C3a e C5a do complemento, drogas como a ACTH sintética, a codeína, a morfina e ionóforos de cálcio (por facilitarem a entrada de Ca^{2+} na célula). (Goldstein & Dembo, 1982)

No interior dos grânulos dos mastócitos e basófilos encontram-se moléculas biologicamente ativas, como a histamina e os leucotrienos. Estas, quando libertadas para o exterior celular causam efeitos no indivíduo, como contração do músculo liso. Encontra-se demonstrado que a histamina provoca a contração dos músculos lisos nas vias principais de passagem de ar, nos pulmões, enquanto os leucotrienos provocam a contração dos músculos das vias periféricas. (Kindt, et al., 2006)

Estas moléculas também afetam a permeabilidade das paredes dos vasos sanguíneos e outras membranas e causam hipersecreção glandular. Numa reação alérgica a libertação de todo o

“corpo” destes mesmos produtos químicos resulta em manifestações associadas a rino-faringite com hipersecreção nasal, broncoconstrição, possível edema laríngeo, entre outros. (Kindt, *et al.*, 2006)

1.3. METODOLOGIAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DO PERFIL ALERGOLÓGICO

1.3.1. PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO DE PÓLEN

A eletroforese consiste na migração diferencial de compostos portadores de carga elétrica, quando submetidos à ação de um campo elétrico. É uma técnica muito utilizada na separação de proteínas e de ácidos nucleicos, uma vez que são moléculas ionizáveis ou com carga.

Neste estudo, realizaram-se duas técnicas de eletroforese: a focagem isoelétrica (IEF) e a SDS-PAGE, explicadas a seguir.

1.3.1.1. FOCAGEM ISOELÉTRICA (IEF)

A técnica de focagem isoelétrica permite separar proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI), num gradiente de pH estável. É usado normalmente como meio de suporte gel de agarose ou poliacrilamida, contendo uma mistura de anfólitos de corrida (ácido poliaminopolicarboxílico sintéticos de baixo peso molecular). A percentagem do gel de poliacrilamida usado é baixa (cerca de 4%), com tamanho do poro grande, de modo a permitir que as proteínas se movam sem problema quando aplicada a corrente. Quando esta corrente é aplicada os anfólitos organizam-se de modo a aumentar o pI do ânodo para o cátodo. Cada anfólito mantém um pH local correspondente ao seu pI, criando assim um gradiente de pH ao longo do gel. A amostra aplicada no gel irá então migrar de acordo com o campo elétrico até chegar à região do gradiente onde o pH corresponde ao seu ponto isoelétrico. Neste ponto, a amostra (proteína) não tem carga elétrica, ficando assim estacionária nesse ponto.

1.3.1.2. SDS-PAGE

A eletroforese SDS-PAGE é muito utilizada para analisar proteínas contudo é um método que separa proteínas desnaturadas, já que o objetivo desta técnica é separar as mesmas de acordo com a sua massa molecular, como já foi referido.

O gel de poliacrilamida, utilizado no método como agente de ligação, é formado a partir da polimerização de monómeros de acrilamida na presença de pequenas quantidades de N,N'-metileno-bis-acrilamida (bis-acrilamida). A matriz formada pode ter diferente porosidade, de acordo com a massa molecular das proteínas que se pretendem estudar. A polimerização do gel é iniciada quando se adiciona persulfato de amónio (PSA) e a base N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED). O TEMED catalisa a decomposição do ião persulfato num radical. É usado então para estabilizar os radicais livres, melhorando a polimerização.

As amostras para poderem correr no SDS-PAGE tem que ser colocadas em ebulição, em tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol e SDS. O mercaptoetanol reduz quaisquer pontes dissulfídicas presentes quebrando assim possíveis estruturas terciárias. O SDS é um detergente

aniónico que se liga a radicais hidrofóbicos das proteínas, causando a sua desnaturação. Uma molécula de SDS liga-se a cada dois resíduos de aminoácidos atribuindo uma carga negativa à proteína desnaturada, “mascarando” a carga intrínseca da molécula nativa. Este tampão também contém um corante, normalmente azul de bromofenol que permite a monitorização da eletroforese, e glicerol ou sacarose que confere densidade à solução de amostra, permitindo assim passar facilmente do tampão de eletroforese para o fundo quando inserido no poço.

Quando todas as amostras se encontram inseridas nos respetivos poços, é ligada uma corrente que passa através do gel. Quando as proteínas passam o gel de concentração e entram no gel de separação, a carga negativa do complexo proteína-SDS continua passar em direção ao ânodo. É aqui que as proteínas se separam. Quanto mais pequena for a proteína mais facilidade tem de atravessar os poros do gel e assim percorre mais espaço no gel. Quando as moléculas de azul de bromofenol chegam ao topo do gel, considerada frente do gel, a corrente é desligada.

Após as proteínas terem “corrido” o gel, é preciso fixá-las, para evitar que difundam quando se procede à coloração do mesmo. O ácido acético a 25% em H₂O é um bom fixador, além de que mantém as proteínas desnaturadas. O gel é de seguida colocado numa solução corante, normalmente Azul de Coomassie e, de seguida, numa solução descorante. O Azul de Coomassie permite visualizar e identificar as proteínas separadas no gel. A sua estrutura apolar permite ligar-se inespecificamente às proteínas. A solução descorante remove o corante não ligado do *background* do gel, deixando as proteínas coradas, visíveis como bandas azuis, num *background* limpo.

1.3.1.3. WESTERN BLOT

O Western Blot é uma técnica que permite identificar e localizar proteínas, com base na sua capacidade de se ligar a anticorpos específicos, utilizando a electroforese como técnica preparativa para promover a separação de proteínas numa mistura.

O termo “blot” refere-se à transferência de amostras biológicas de um gel para uma membrana e a sua deteção na superfície da mesma. Esta técnica também é denominada de *immunoblotting* pois é usado um anticorpo para detetar especificamente o antigénio pretendido. É possível obter resultados quantitativos e semi-quantitativos sobre a proteína em estudo, permitindo saber o tamanho da mesma.

O gel de eletroforese é um meio pouco apropriado para a imunodeteção, isto é, não é um bom suporte para as ligações antigénio/anticorpo. Assim sendo, utilizam-se membranas constituídas geralmente nitrocelulose, nylon ou fluoreto de polivinilideno (PVDF). Depois de transferir as proteínas para esta matriz, o passo seguinte é bloquear a membrana para prevenir ligações não específicas na superfície da membrana. Para bloquear a membrana geralmente usa-se leite em pó desnatado, mas polímeros sintéticos como a poli-vinil-pilorridona (PVP) também podem ser usados, principalmente em casos nos quais os componentes do leite prejudicam a ligação antigénio/anticorpo. Para transferir o antigénio do gel de eletroforese para a membrana submete-se o gel a um campo elétrico (mesmo princípio da eletroforese referido acima). De uma forma sucinta, a membrana é colocada sobre o ânodo (+) coberta por vários papéis de filtro e, em seguida, coloca-se o gel, que entrará em contato com o cátodo (-), também fica coberto através de papéis de filtro,

fazendo com que as proteínas, ainda embebidas em SDS (-), possam migrar para o ânodo. Este “sanduíche” é mostrado na Figura 10.

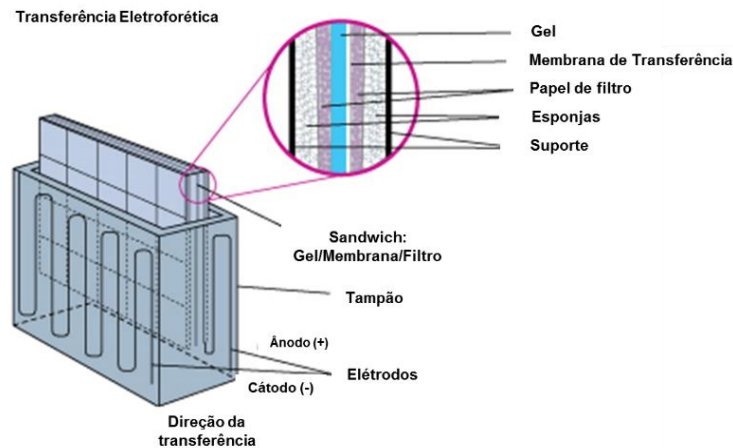


FIGURA 10 - Representação esquemática da transferência electroforética no Western Blot. Adaptado de www.piercenet.com

A membrana é depois incubada com anticorpos específicos para a proteína alvo (anticorpo primário). O último passo permite detetar a proteína através da ligação com o anticorpo primário recorrendo-se à ligação de um segundo anticorpo, anticorpo secundário. Este anticorpo é conjugado com uma enzima (ex. fosfatase alcalina ou peroxidase) que funciona como um sinalizador molecular, permitindo a visualização do local da proteína detetada. Para que a enzima seja visualizada é necessário colocá-la na presença de uma mistura reativa específica. Métodos mais sensíveis, como é o caso deste, usam um substrato quimiluminescente que, quando combinado com a enzima produz luz como bioproducto. Esta luz é detetada através de uma câmara de imagem apropriada para detetar quimiluminescência. Independente do substrato usado, a intensidade de luz obtida está correlacionada com a quantidade de antigénio presente na membrana. Este método denomina-se de indireto pois envolve um segundo anticorpo para permite detetar a proteína (Figura 11). (Scientific, 2009)

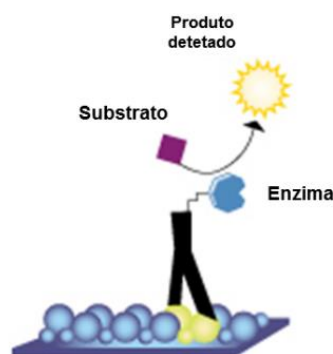


FIGURA 11 - Representação esquemática da técnica de Western Blot, no método indireto. Adaptado de (SCIENTIFIC, 2009)

1.3.1.4. QUANTIFICAÇÃO DO ALERGÉNIO

A quantificação do alergénio foi realizada pelo método de Bradford. Este método baseia-se na interação entre o corante Coomassie Blue e as cadeias aromáticas ou básicas das proteínas. No pH da reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o

deslocamento do equilíbrio do corante da forma aniónica (vermelha) para a forma catiónica (azul), que absorve fortemente a 595 nm (Zaia, *et al.*, 1998).

1.3.2. MÉTODOS MAIS UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS ALÉRGICAS

O ambiente atmosférico contém uma variedade de partículas e algumas delas, como vem sido referido, podem desencadear sintomas e doenças respiratórias como asma e alergia.

Na tentativa de determinar os acionadores específicos dos pacientes atópicos, vários estudos clínicos têm sido realizados, nomeadamente acerca da prevalência da sensibilização aos diferentes alergénios. Existem para tal técnicas *in vivo* e *in vitro*. Abaixo estão descritos as técnicas atualmente mais usadas.

a) Teste *in vivo*: Skin Prick Test - SPT

O teste de Prick é um teste cutâneo onde se administra uma pequena gota de vários alergénios na pele, de modo a saber quais provocam reação alérgica no paciente. A pápula que se forma na sequência da administração dos alergénios é medida, sendo a sua dimensão um possível indicador da severidade da doença.

As reações cruzadas, associadas a questões que se prendem com a execução técnica do teste, tornam os resultados muito variáveis e, por vezes, difíceis de interpretar.

b) Teste *in vitro*: ImunoCAP e ISAC

O ImunoCAP e o ISAC são testes *in vitro*, que se executam mediante uma análise ao sangue, que permite confirmar o teste cutâneo realizado. Neste exame, é analisada a quantidade de IgE que são produzidos pelo sistema imunitário quando adicionados alergénios específicos. Se o doseamento de IgE específica for elevado o paciente é sensibilizado aos alérgenos em questão. Estes testes apresentam a vantagem de permitir conhecer o perfil de IgE específica do indivíduo alérgico, permitindo obter, um alergograma individual. Apresentam, contudo, a desvantagem de ser previamente necessário conhecer a história clínica do paciente, pois as reações cruzadas são comuns, podendo originar resultados erróneos.

1.3.3. USO DE BIOSENSORES CELULARES: LINHA CELULAR RBL-H21.

Os métodos imunológicos alteram a integridade dos alergénios, destruindo epítomos importantes *in vivo*, não sendo então possível estudar como as proteínas têm a capacidade para induzir reação de hipersensibilidade do tipo I.

Muitas vezes estes testes não estão correlacionados com os testes de Prick, já que, como já foi referido, existem alergénios em pequena quantidade que podem não ser detetados. Para além disso, nos SPT não podem ser usados como controlo, por razões éticas, e o estudo da libertação de histamina utilizando o soro de pacientes não é prático como técnica de rotina. Por outro lado, muitas

vezes os extratos alergénicos utilizados nestas técnicas apenas se encontram padronizados para alguns alergénios major, que podem não ser, necessariamente, os causadores de sintomas alérgicos. Finalmente, os testes *in vitro* permitem a determinação de alguns alergénios, por exemplo, recorrendo a ELISA específicos, que para além de serem trabalhosos e dispendiosos não dão informação sobre a eventual severidade da resposta biológica.

De modo a procurar-se desenvolver um teste, *in vitro*, que determina a atividade biológica de extratos alergénicos, baseada nas reações de hipersensibilidade do tipo I, nomeadamente na ativação e libertação dos mediadores químicos, aquando da desgranulação dos mastócitos e basófilos (Vogel, *et al.*, 2005).

Para o efeito foi desenvolvida uma linha celular em que os genes do recetor de alta afinidade para a IgE (FcεRI) foram transfectados na linha celular RBL (basófilos de rato com leucemia). A linha celular RBL tem sido usada para estudos das características de estrutura e ligação do recetor de IgE. Existem dois clones que são normalmente usadas, a RBL-2H3 e RBL-h21, por se ter comprovado a sua eficácia na libertação de histamina. (Barsumian, Iersshky, Petrino, & Siraganian, 1981) e que tem sido utilizado em padronização de extratos de pólen.

A β-hexosaminidase é conhecida como um componente específico dos grânulos dos mastócitos e basófilos e a sua libertação devida à desgranulação das células em questão é realizada em paralelo com a libertação de histamina. Esta enzima lisossomal hidrolisa os resíduos de N-acetil-D-hexosamina em N-acetil-β-D-hexosaminidase (Aronson & Kuranda, 1989), atuando em glucósidos, galactósidos e vários oligossacáridos. Por ser mais fácil de determinar e não requerer o recurso a técnicas caras, a determinação da atividade de β-hexosaminidase para estudar a reação de hipersensibilidade do tipo I é a mais utilizada neste momento. Atualmente, os métodos para quantificar a atividade da β-hexosaminidase são colorimétricos ou fluorométricos, com recurso a substratos enzimáticos, nomeadamente, o substrato pNAG (p-nitrofenil – N – acetil-D-glucosaminida) que origina o p-nitrofenol, um composto corado que pode ser quantificado por espetrometria molecular ao comprimento de onda de 405nm.

Este método, que permite estudar a atividade biológica dos extratos, sem recurso direto de seres humanos, consiste num número de passos que incluiu a sensibilização das células com IgE (de soros humanos), a estimulação com antigénio e a remoção do sobrenadante resultante da estimulação para quantificar a β-hexosaminidase libertada durante a reação.

Nesta técnica as células são sensibilizadas com IgE *overnight*. Ao tampão usado nesta técnica (tampão Tyrodes) adicionou-se 50% de D₂O ao tampão de diluição de Anti-IgE e extratos alergénicos (ver Anexo III). O mecanismo de ação de D₂O ainda não está claro mas acredita-se que estabiliza os microtúbulos e/ou radicais produzidos durante a cascada de transdução de sinal, aumentando assim a estabilidade e secreção da β-hexosaminidase (Vogel, *et al.*, 2005). Depois de estimuladas as células com Anti-IgE ou extrato natural é recolhido o sobrenadante e adiciona-se o substrato que permitirá quantificar o mediador: pNAG, que produz 4-nitrofenol quando é clivado pela β-hexosaminidase. O último passo consiste em adicionar a solução Stop (tampão glicina, ver Anexo III) que, devido ao seu pH básico (pH = 10), dá origem a uma reação que produz um produto colorimétrico, (amarelo), que absorve a 405nm. A quantidade de p-nitrofenol formado é proporcional

à quantidade de β -hexosaminidase presente no sobrenadante, sendo então possível quantificar a enzima. (Figura 12)

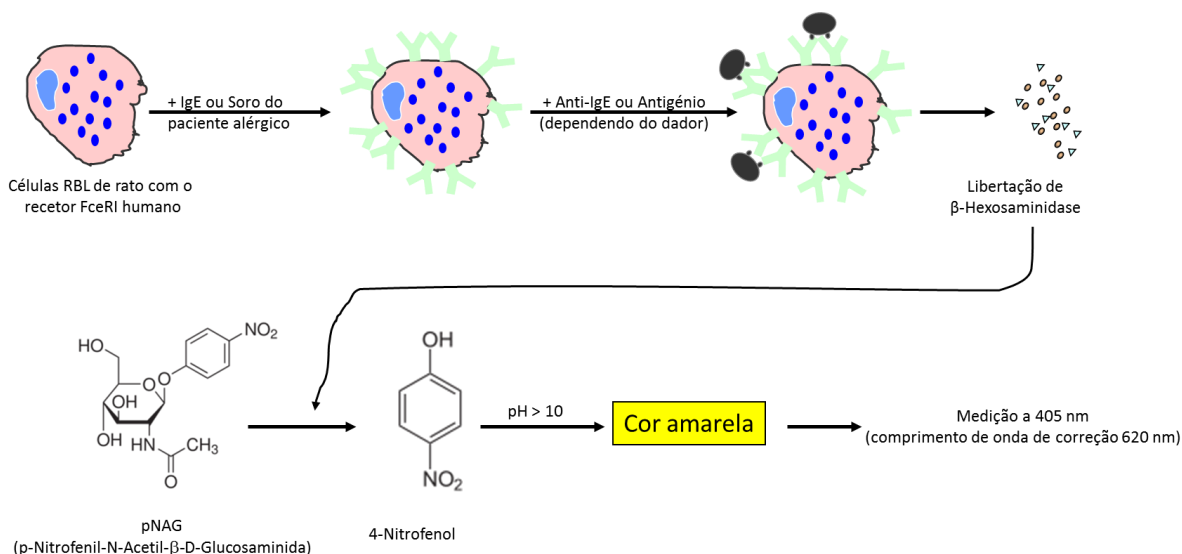


FIGURA 12 - Representação esquemática do imunoensaio, utilizando a cultura celular RBL (Adaptado de Protocolo fornecido pelo ZAUM)

O conteúdo total de β -hexosaminidase é determinado a partir de células lisadas com Triton X-100. A libertação específica do alergénio é dada em percentagem, do total do conteúdo libertado pelas células, depois de corrigida a libertação espontânea que, normalmente, é cerca de 2-5%. (Vogel, 2004)

Os resultados destes estudos são apresentados sob a forma de curvas de dose resposta, onde se encontra representada a percentagem de β -hexosaminidase libertada versus o logaritmo da concentração de alergénio. São caracterizadas por apresentarem um aumento inicial, que reflete o número de anticorpos IgE que estão ligados ao alergénio e, no final da curva, muitas vezes, é possível observar o fenómeno de inibição, devido ao excesso de alergénio, o que é representado por uma queda na libertação de β -hexosaminidase.

No que diz respeito à investigação associada às doenças alérgicas, embora existam diversas metodologias disponíveis que permitem compreender melhor como o sistema imunitário reage contra os alergénios, o processo de sensibilização ainda não está bem compreendido. Por outro lado, devido a variabilidade do próprio pólen, desconhecem-se hoje em dia indicadores como a relação entre a severidade da reação alérgica e a quantidade de alergénio que a desencadeia.

Neste estudo foi utilizado um imunoensaio biológico, com uso de soros de pacientes alérgicos a *Olea europaea*. Os imunoensaios para quantificação de anticorpos IgE específicos podem ser usados para avaliar a potência alérgica do pólen.

1.3.4. FACS

A análise FACS (Fluorescence Assisted Cell Sorting) é uma técnica de citometria de fluxo que permite avaliar, quantificar e classificar as proteínas da membrana celular e intracelular, bem como péptidos e DNA. A técnica baseia-se na ativação células por indução de fluorescência, sendo

que tem como base uma reação antigénio-anticorpo, com o anticorpo a possuir um elemento fluorescente que permite então a análise. A suspensão de células passa por um capilar, onde cada célula é estimulada por um laser. O FACS permite também distinguir diferentes populações celulares e, por isso, para além do anticorpo específico, são adicionados diferentes anticorpos marcados com fluorocromos (vermelho e azul claro). Nesta técnica mediu-se o parâmetro SSC (Side Scatter), para avaliar a complexidade da célula, e o parâmetro FSC (Forward Scatter), que mede o tamanho relativo da célula, permitindo assim conhecer a morfologia celular e conseguir selecionar apenas os basófilos presentes em solução.

No que diz respeito ao procedimento, as células foram colocadas em crescimento com G418, o antibiótico de seleção específico (co-transfectado com sequências humanas), usado para selecionar as células com o recetor FcεRI. Após duas semanas em crescimento com MEM suplementado com antibiótico, as células foram passadas e cultivadas com MEM suplementado, sem G418. Uma semana depois a análise FACS foi realizada às três culturas de células diferentes, congeladas em 2007, 2009 e 2010. Esta técnica foi realizada com a colaboração de Renate Effner e Angelina Przychodzki's (pertencentes ao grupo de investigação do Prof. Dr. Jeroen Buters). Os resultados obtidos foram tratados através do software FACSDiva Version 6.2.

1.3.5. SEM (MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO)

A microscopia eletrónica de varrimento permite obter imagens de alta ampliação (até 300 000x) e resolução. As imagens obtidas representam a transcodificação da energia emitida pelos eletrões excitados, contrariamente à radiação de luz que se obtém com outras técnicas de microscopia. O princípio da técnica passa pela emissão de um feixe de eletrões por um filamento capilar de tungsténio, mediante a aplicação de uma diferença de potencial. De seguida dá-se a atração dos eletrões gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo, obtendo-se assim a imagem. O material observado tem que ser desidratado e metalizado, onde se deposita uma fina camada de metal, normalmente ouro, no material.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como principal objetivo o desenvolvimento de uma abordagem metodológica baseada em biossensores celulares para a determinação da carga alérgica em amostras provenientes do meio ambiente;

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A concretização do objetivo geral deste trabalho implica duas componentes importantes indispensáveis que consistem em, por um lado, estabelecer uma cultura da linha celular de basófilos de rato modificada e que expressa de forma constitutiva o recetor humano de IgE de alta afinidade, o Fc ϵ RI, e por outro, a obtenção de soros de pacientes sensibilizados ao pólen de oliveira e que serão usados para sensibilizar as células para que estas possam detetar seletivamente os alérgenos do pólen de oliveira.

Assim, os objetivos específicos deste trabalho consistem no(a):

- Análise dos alergogramas dos soros de pacientes sensibilizados a pólen de *Olea europaea*
 - Preparação de um extrato aquoso de pólen de *Olea europaea*, da região do Alentejo;
 - Caracterização e análise do perfil proteico do extrato de pólen pelas técnicas de IEF e SDS-PAGE;
 - Determinar as bandas imunorreativas por Western Blot para os soros individuais (alergogramas);
 - Seleção dos soros que apresentam imunoreatividade mais intensa;
- Constituição do biossensor;
 - Estabelecimento da cultura da linha RBL-h21
 - Sensibilização com os soros selecionados;
 - Análise da resposta celular ao estímulo com extratos de pólen do meio ambiente

3. PROBLEMA

Os pólenes constituem a segunda causa de alergia respiratória não estando ainda esclarecido o mecanismo pelo qual são desencadeadas, doença que se enquadra no grupo das reações de hipersensibilidade do tipo I sendo um problema complexo e multifatorial em que diversas variáveis, controláveis ou não pelo ser humano, condicionam a evolução da doença. Atualmente a polinose representa 10 a 15% das doenças alérgicas e afeta 25% dos indivíduos com alergia respiratória (Puc, 2003), (Valenta & Kraft, 2002).

Em termos bioquímicos, a doença atópica é caracterizada pela produção de IgE específica para o alergénio que, ao ligar-se aos mastócitos ou basófilos, induz a desgranulação das células, conduzindo ao processo inflamatório (Kindt, Osborne, & Goldsby, 2006). Cada indivíduo pode apresentar um perfil específico de IgE – alergograma - que determina ou condiciona a resposta aos diferentes alergénios. Alguns estudos *in vitro* demonstram que a intensidade de desgranulação de mastócitos e basófilos aumenta com o número de moléculas de IgE que são reticuladas durante o processo (Stone, Prussin, & Metalfe, 2010), e que o aumento da concentração de alergénio disponível provoca o aumento da desgranulação de mastócitos (Buters & al., 2012), podendo estes factores relacionar-se com a gravidade dos sintomas apresentados pelos pacientes alérgicos.

No entanto, as metodologias existentes hoje em dia não permitem determinar um limiar de resposta ou esclarecer a relação entre a dose e a gravidade do processo inflamatório resultante porque não existe um sistema eficiente que permita determinar a exposição a aeroalergénios.

O pólen também contém proteínas altamente conservadas e com grau de homologia variável, presentes em várias espécies, que são responsáveis pelas reações cruzadas (Cariñanos & Casares-Porcel, 2011). O conhecimento dos padrões de alergenicidade cruzada, entre diferentes tipos de pólen, é essencial para a explicação de muitos sintomas alérgicos para os quais não se conhece uma causa aparente.

Os principais objetivos do trabalho consistem em estudar a sensibilização dos pacientes a *Olea europaea* procurando também determinar o perfil de IgE's específicas de soros de pacientes e estudar o potencial de reatividade cruzada com as espécies polínicas existentes na região do Alentejo. Por último, pretende-se otimizar a utilização da cultura celular RBL para estudar o efeito dos extratos naturais obtidos na cidade de Évora, no ano de 2011, nos soros dos pacientes sensibilizados a *Olea europaea*, de modo a verificar se é possível utilizar este modelo como estudo pré-clínico, para além do uso dos testes de Prick.

4. METODOLOGIA

4.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1.1. EXTRAÇÃO DO ALERGÉNIO *OLEA EUROPAEA* A PARTIR DE PÓLEN NATURAL

O pólen, recolhido na cidade de Évora, foi macerado de modo a se dar o rompimento dos grãos de pólen. Procedeu-se à extração com tampão bicarbonato de amónio pH 8,1 e colocou-se num agitador (*in an end over-end rotator*) durante quatro horas, a 60rpm, protegido da luz. Após este passo, centrifugou-se primeiro a 1000g, a temperatura ambiente, durante 5 minutos, recolheu-se o sobrenadante e centrifugou-se a 1500g durante 10 minutos, nas mesmas condições. O sobrenadante foi recolhido e preparam-se alíquotas de 1mL. As amostras foram armazenadas a -80°C e posteriormente liofilizadas.

4.1.2. QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD

A quantificação da proteína obtida no extrato de pólen foi realizada pelo método de Bradford. Este método baseia-se na interação entre o corante Coomassie Blue e as cadeias aromáticas ou básicas das proteínas. No pH da reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante da forma aniónica (vermelha) para a forma catiónica (azul), que absorve fortemente a 595nm (Zaia, Zaia, & Lichtig, 1998).

Para tal, construiu-se uma curva de calibração, com padrões de BSA entre as concentrações 250µg/mL e 2,5µg/mL. As amostras e os padrões foram aplicados numa microplaca (10µL) em triplicado e de seguida adicionou-se 200µL do reagente de Bradford. Incubou-se a placa durante 5 minutos, à temperatura ambiente e leu-se no leitor de microplacas a 630nm.

4.1.3. IEF PARA DETEÇÃO DE ALERGÉNIO

A IEF em gel de poliacrilamida foi preparada de acordo com o protocolo para o modelo da Bio-Rad 111 Mini IEF Cell. Depois de montar a película e o vidro na placa de eletroforese preparou-se a solução base. Para um volume final de 5mL, adicionou-se 2,75mL de água destilada, 1,5mL de concentrado de monómeros, 1mL de glicerol e 0,25mL de anfólitos. Juntaram-se os catalisadores (25µL FMN, 1,5µL de TEMED e 7,5 µL de PSA) em separado e de seguida adicionou-se à restante solução, de modo a iniciar a polimerização do gel. Pipetou-se a solução final entre a placa de eletroforese e o suporte da película e do vidro, colocou-se uma luz fotopolimerizadora de forma a incidir sobre o gel e aguardaram-se cerca de 45 minutos até o gel polimerizar (Figura 13). Depois do gel polimerizado retirou-se da placa e aplicaram-se 2µL de amostra e de padrão A (pH 3-10).



FIGURA 13 - Polimerização do gel de poliacrilamida, com uso de luz fotopolimerizadora

O gel foi colocado na câmara externa onde se realizou a corrida eletroforética. As condições de corrida foram:

- 100 V- 15 minutos
- 200 V- 15 minutos
- 450 V- 1 hora

Terminada a corrida, o gel foi retirado e colocado na solução fixadora (4% ácido sulfúrico, 12,5% ácido tricloroacético, 30% metanol), durante 15 minutos.

No que diz respeito à focagem isoelétrica em gel de agarose, montou-se a película no vidro (com ajuda de algumas gotas de água) e colocou-se a placa de eletroforese na estufa, a 55°C. Adicionou-se num tubo de Falcon 0,1g de agarose, 0,5g de sorbitol, 4mL de glicerol 25% e 2mL de água destilada. Colocou-se a mistura em banho-maria, em agitação. Depois de dissolvida a solução, retirou-se do banho-maria e colocou-se o tubo no banho termostatzado, em agitação contínua, de modo a atingir os 55 °C. Adicionou-se 0,5µL de anfólitos 40%. Pipetou-se a solução sobre a placa pré-aquecida e colocou-se o vidro com a película sobre a solução, evitando a formação de bolhas. Aguardaram-se entre 10 a 15 minutos até o gel polimerizar. Colocou-se o gel a 4°C durante, no mínimo, 4 horas ou *overnight*. Aplicaram-se as amostras e o padrão no gel e montou-se na câmara externa, para realizar a corrida eletroforética (Figura 14). As condições de corrida foram:

- 100 V- 15 minutos
- 200 V- 15 minutos
- 450 V- 1 hora



FIGURA 14 - Equipamento da corrida eletroforética para técnica de focagem isoelétrica

Terminada a corrida, desligou-se a fonte de alimentação, retirou-se a película que continha o gel e colocou-se na solução fixadora (3,5% ácido sulfosalicílico, 5% ácido tricloroacético, 30% metanol), durante 15 minutos ou preparou-se a transferência (técnica de Western Blot).

Para ambas as técnicas, quando não se realizou a transferência do gel, depois de passar pela solução de fixação, colocou-se em 95% etanol, de modo a obter um *background* limpo, durante 30 minutos, em agitação. De seguida, colocou-se na solução corante (0,2% Coomassie Brilliant Blue R-250, 28% etanol e 14% ácido acético), durante pelo menos 30 minutos, em agitação, a temperatura ambiente. O gel foi colocado em solução descorante I (12% etanol, 7% ácido acético e 0,5% de sulfato de cobre) *overnight*, em agitação e a temperatura ambiente e, por último colocou-se em solução descorante II (25% etanol, 7% ácido acético) até obter um gel limpo e limpo de sulfato de cobre.

4.1.4. SDS-PAGE PARA DETEÇÃO DO ALERGÉNIO

A técnica de SDS-PAGE foi realizada com base no método de Laemmli e utilizando o modelo Mini-Protein III Cell, da Bio-Rad. Depois de montado o sistema de eletroforese, preparou-se o gel de resolução a 7,5% de acrilamida (1,5 M Tris-HCl pH 8,8; SDS 10%, Solução Bis/Acrilamida 30% e água destilada) e por último adicionaram-se os polimerizadores (PSA 10% fresco e TEMED). Adicionou-se a solução no sistema, sem criar bolhas e aguardou-se o gel polimerizar, durante cerca de 30 a 45 minutos. A água foi removida e preparou-se o gel de concentração a 4% de acrilamida (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, SDS 10%, solução Bis/Acrilamida 30%, água destilada; PSA 10% e TEMED), adicionando-se acima do gel de resolução, até ao topo do vidro do sistema. Deixou-se polimerizar durante 30 a 45 minutos. Retirou-se o gel do pente, montou-se a câmara interna do sistema de SDS e encheu-se com tampão de corrida pH 8,3 (Tris-HCl 250 mM; Glicina 250 mM; SDS 0,1%).

As amostras foram diluídas em tampão de amostra 6x (Glicerol 30%, Tris-HCl 1,5M, SDS 12%, DTT 600 mM e Azul de bromofenol 0,06%, pH 6,8) e colocadas durante 5 min a 95°C para desnaturar. As amostras e o padrão fornecido pela Bio-Rad (Precision Plus Protein Dual Color) foram pipetados nos respetivos poços. Encheu-se a câmara externa do sistema de montagem com tampão de corrida (Figura 15) ligou-se a fonte de alimentação nas seguintes condições: voltagem constante, 140V (60 mA, 15 Watt). A corrente foi desligada quando o Azul de bromofenol atingiu o fim do gel (cerca de 1,30h a 2h depois). Removeu-se o gel da cassette e colocou-se na solução corante (45% metanol; 10% ácido acético; 0,5% Coomassie Blue) ou, caso seja para realizar Western Blot, prepara-se o gel para a transferência. Os géis que foram para a solução corante passaram para a solução descorante (30% metanol; 10% ácido acético) no dia seguinte, colocando-os em agitação, a temperatura ambiente.

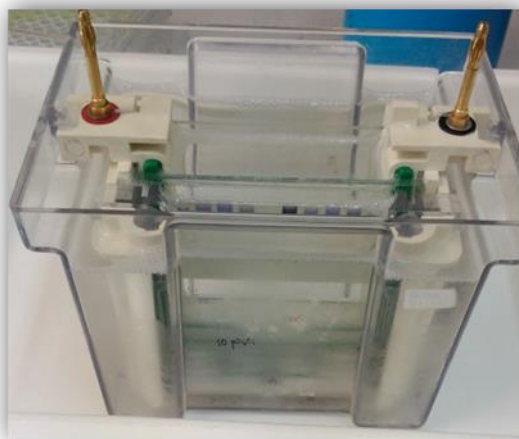


FIGURA 15 - Sistema de SDS-PAGE, com amostras e padrões já aplicadas nos respetivos poços

4.1.5. WESTERN-BLOT PARA OBTENÇÃO DOS ALERGOGRAMAS

A técnica de Western-Blot é realizada da mesma forma, quer para os géis obtidos na IEF como para os obtidos pela técnica de SDS-PAGE, apenas diferem na preparação da transferência dos géis e na imersão da solução de Ponceau S.

O primeiro passo é ativar a membrana de PVDF, humedecendo-a durante 10 segundos em metanol 100%, 5 minutos em água destilada e 20 minutos em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM; Glicina 192 mM; Metanol 20%; SDS 0,037%, pH 8,3), juntamente com o gel SDS. Os géis estão assim prontos para serem transferidos para membrana. Dependendo da técnica anterior, as condições foram as seguintes:

- géis de SDS: transferência durante 1 hora, 400 mA, corrente constante e a 4°C.
- géis de IEF: a membrana foi colocada sobre o gel, seguida por papel absorvente, um vidro e um peso, e deixou-se transferir durante 1 hora.

Para os géis de SDS, depois da transferência, a membrana foi colocada na solução de Ponceau S (0,2%) durante 5 minutos e de seguida foi lavada com água destilada três vezes, cada lavagem com a duração de 1 minuto. Nos géis de IEF, o passo seguinte é logo o bloqueio.

As membranas foram bloqueadas em solução de TBS-T (Tris-HCl 25 M.; NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,6) com leite em pó (4 g de leite para 20mL de TBS-T), durante 1 hora, em agitação. De seguida, foram lavadas três vezes com TBS-T, sendo que cada lavagem teve a duração de 15 minutos. O passo seguinte foi incubar com o anticorpo primário, ou seja, com os soros dos pacientes, durante 2 horas à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C, com agitação. Os soros foram recolhidos nas consultas externas do Hospital do Espírito Santo de Évora, cedidos pela Doutora Luísa Lopes.

Depois da incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-T quatro vezes, sendo que cada lavagem teve a duração de 10 minutos. Incubou-se com o anticorpo secundário (Pierce Mouse anti-Human IgE (AP)), em TBS-T, durante 2:30 h, com agitação, à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C.

As membranas foram de seguida lavadas com TBS-T quatro vezes, sendo que cada lavagem teve a duração de 10 minutos. A revelação das membranas foi realizada, utilizando como

substrato a fosfatase alcalina. Seguidamente, as membranas foram lavadas com Por último, as membranas foram reveladas, utilizando como substrato a fosfatase alcalina.

4.1.6. IMUNOENSAIO BIOLÓGICO COM LINHA CELULAR RBL-H21 – LIBERTAÇÃO DE β -HEXOSAMINIDASE

Uma alíquota da linha celular RBL-h21, guardada em azoto líquido, foi descongelada de acordo com o procedimento normal em culturas celulares. As células descongeladas foram mantidas em frascos para cultura de células aderentes, de 75 cm³, em meio mínimo essencial (MEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (FCS) e 1% de L-Glutamina 2 mM, a 37°C e 5% de CO₂ (Figura 16). As células foram mantidas em crescimento, realizando duas passagens por semana, de modo a que as mesmas atingissem a sua máxima atividade, que acontece cerca de 4 a 6 semanas depois do congelamento. As passagens foram realizadas através da técnica mecânica, utilizando um raspador de células e procedendo de seguida à centrifugação (1000 rpm, 5 min), de modo a remover resíduos de células e produtos das mesmas.



FIGURA 16 - Frasco de cultura de células com cultura celular RBL-h21

Quando as células atingiram uma atividade considerável (4 semanas depois) foi possível dar início ao ensaio biológico. Para tal, é necessário semear um frasco de cultura com 5×10^6 células/frasco. As células foram então passadas utilizando o procedimento acima referido e, de seguida, procedeu-se à contagem das células viáveis, com uso de câmara de Neubauer. Mantiveram-se durante 5 dias, a 37°C e 5% de CO₂. No dia seguinte, observaram-se as células ao microscópio e mudou-se o meio, esperando-se que estejam 80-90% confluentes. Ao sétimo dia após semear as células estas foram plaqueadas em placas de 96 poços, específicas para células aderentes. Para realizar este passo as células foram removidas do frasco através do raspador de células e a suspensão foi centrifugada (1000rpm, 5min). Lavaram-se as células duas vezes, com MEM sem suplementos e de seguida procedeu-se à contagem. Ressuspenderam-se as células no volume necessário de modo a ter $1,5 \times 10^6$ células/mL. Adicionou-se 50 μ L da suspensão, por poço, na microplaca. Incubou-se a placa durante uma hora, a 37°C e 5% de CO₂.

A sensibilização das células é realizada no mesmo dia do plaqueamento, e após uma hora do mesmo, para que a ligação da IgE aos basófilos aconteça enquanto as células ainda estão a aderir ao poço e de modo a que o crescimento se dê nas condições normais até ao dia seguinte. Neste passo é adicionada IgE humana (Calbiochem), para construção da curva, e o(s) soro(s) do(s) paciente(s) que se pretendem analisar. A IgE humana é diluída em MEM suplementado com 1% de

pen-strep e de modo a ter uma concentração final de 0,16 µg/mL no poço. Os soros foram diluídos da mesma forma contudo as diluições dependeram de cada um. Adicionou-se 50 µL por poço e incubou-se *overnight*, a 37°C e 5% de CO₂.

No dia seguinte foi realizado o último passo do ensaio, a estimulação, onde já não é necessário trabalhar em condições estéreis. As células foram observadas ao microscópio ótico e lavadas três vezes com tampão de lavagem Tyrodes (130 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 1.4 mmol/L CaCl₂, 5.6 mmol/L Glucose, 10 mmol/L HEPES e 0,1% de BSA, em água destilada, pH 7,45. De seguida, preparam-se as diluições de Anti-IgE, com concentrações a variar entre 0,2 e 0,0002mg/mL de modo a ter sete concentrações diferentes para construção da curva com IgE e, quando utilizado, as diferentes concentrações de extrato natural. Tanto a Anti-IgE como os extratos foram diluídos em tampão de diluição Tyrodes 1x (com 50% de D₂O) e adicionou-se 100µL por poço de cada diluição, em duplicado. Incubou-se durante uma hora, no banho termostaticado, a 37°C.

O ensaio enzimático, onde é possível quantificar a β-hexosaminidase, foi realizado numa placa de 96 poços, sem qualquer tratamento. Após a hora de incubação adicionou-se em cada poço 30µL da solução de pNAG (1,3 mg/L p-nitrofenil N-acetil β-D-glucosaminida em 0,1 mol/L tampão cítrico, pH 4,5) e 50µL do sobrenadante obtido da estimulação das células e incubou-se a placa uma hora, no banho termostaticado, a 37°C. Por último, parou-se a reação adicionando 100 µL de Solução Stop (0.2 mol/L glicina, em água destilada, pH 10,7) e leu-se a OD a 405nm (e 620nm para correção), num leitor de microplacas.

Neste ensaio são realizados quatro diferentes controlos: (Figura 17)

- Total-Release (Libertação total, controlo positivo) – permite conhecer o conteúdo total de β-hexosaminidase presente nas células. Adiciona-se 1% Triton X em PBS de modo a provocar a lise.
- Spontan-Release (Libertação espontânea, controlo negativo) – permite conhecer qual a libertação basal das células quando não aplicada qualquer estimulação. Adiciona-se Tampão Tyrodes.
- IgE controlo – conhecer libertação das células sem existir estímulo com qualquer antigénio.
- Anti-IgE Controlo – conhecer libertação das células sem existir a sensibilização com IgE.

Para além destes quatro controlos principais, quando se quantifica a libertação de β-hexosaminidase em soros e se utiliza para a estimulação extratos naturais, são necessários também os seguintes:

- Controlos dos soros dos pacientes, para todas as concentrações utilizadas – controlo positivo (1% Triton X em PBS) e controlo negativo, sem estimulação
- Controlos dos extratos utilizados – sem sensibilização das células.

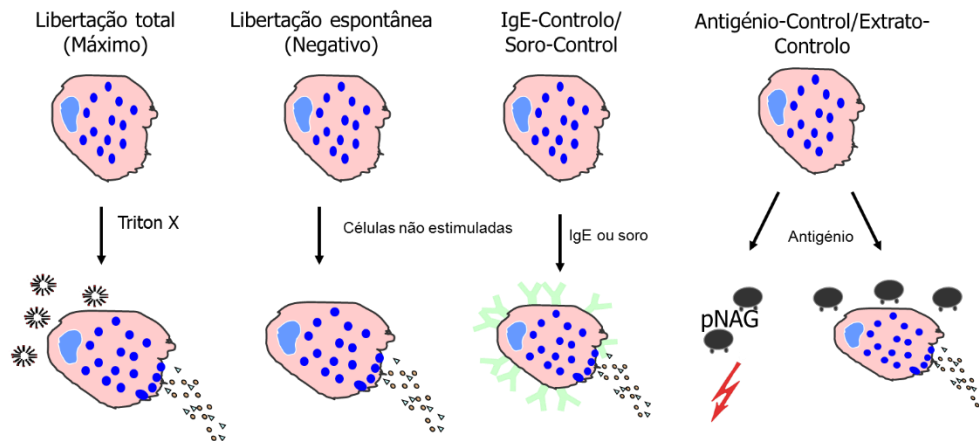


FIGURA 17 - Esquema de ação de cada controlo utilizado no imunoenensaio com cultura celular RBL. (adaptado de protocolo fornecido pelo ZAUM)

A liberação específica de β -hexosaminidase foi corrigida tendo em conta a atividade espontânea e os resultados foram expressos numa curva de dose resposta IgE/anti-IgE, construída através do software OriginLab® e Excel.

4.2. MATERIAL E EQUIPAMENTO

- **Material**
 - Almofariz
 - Balões volumétricos
 - Esguicho
 - Espátulas
 - Frascos de cultura celular (BD Falcon)
 - Gobelés
 - Luvas descartáveis
 - Magnetes
 - Máscaras descartáveis
 - Micropipetas P2, P10, P20, P100, P200, P1000 e respetivas pontas estéreis e não estéreis
 - Micropipeta multicanal
 - Microtubos estéreis e não estéreis
 - Parafilme
 - Pilão
 - Pinças
 - Pipetas de vidro estéreis
 - Placas de 96 poços para cultura de células (Fa. Nunc, cat. 167008).
 - Placas de 96 poços para ELISA (Nunc.)
 - Provetas volumétricas
 - Raspador de células
 - Tubos de centrifuga

- Tubos de Falcon estéreis e não estéreis
- Unidade de filtração

- **Equipamentos**
- Agitador magnético
- Balança analítica (Metler HK 160)
- Banho seco (Grant)
- Banho termostaticado
- Bio-Rad Gel-doc (sistema e software)
- Medidor de pH: Inolab pH Level 1
- Medidor de pSistema de eletroforese Mini-Protean-3 da Bio-Rad (USA)
- tema Mini Trans-Blot Electroforetic Transfer Cell da Bio-Rad (USA)
- Sistema de IEF Model 111 Mini IEF Cell da Bio-Rad (USA)
- Camara de Neubauer
- Leitor de microplacas
- Câmara de fluxo laminar
- Microscópio ótico
- SEM
- FACS Fortessa

4.3. REAGENTES

- NH_4HCO_3 ;
- H_2O destilada
- Reagente de Bradford: Para 1L, 100 mg de Azul de Coomassie G-250 em 50mL de etanol a 95%; 100mL de ácido fosfórico a 85%
- Glicerol
- Tris-HCl
- SDS
- DTT
- Azul de bromofenol
- Bis/Acrilamida
- APS
- TEMED
- Glicina
- Metanol
- Ácido acético
- Coomassie Blue R-250
- Ponceau S
- Tween-20

- NaCl
- Azida de sódio
- BSA
- Riboflavina
- Ácido sulfossalicílico
- Etanol
- Isopropanol 80%
- 0,5% sulfato de cobre II
- Agarose
- Anfólitos
- Sorbitol
- MEM 1X (GIBCO)
- Solução Azul de Tripano
- IgE humana (Fa. Calbiochem #401152)
- Anti-IgE humana (Fa. Dako #A0094)
- p-nitrofenol (Sigma)
- NaH_2PO_4 (x 2 H_2O)
- MgCl_2 x 6 H_2O
- CaCl_2 (1M)
- Glucose
- HEPES
- D_2O
- 10% HCl
- Triton X
- PBS
- Na_2HPO_4
- 0,4 M Ácido cítrico monohidratado
- Glicina
- 10 N NaOH
- 1% Pen/Strep
- 2 mM L-Glutamina
- 20% FCS
- G418

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PARTE I – CARACTERIZAÇÃO DE UM EXTRATO DE PÓLEN: PERFIL PROTEICO E ALERGOLÓGICO PARA A POPULAÇÃO EM ESTUDO

5.1.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE UM EXTRATO DE PÓLEN DE OLIVEIRA

O pólen de *Olea europaea* foi quantificado pelo método de Bradford. A curva de calibração obtida encontra-se representada no Anexo I.

A concentração de proteína no extrato foi determinada pela interseção na curva de calibração. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 - Valores de OD e de concentração de proteína obtida nas diferentes diluições do extrato de *Olea europaea*, pelo método de Bradford.

| Diluição do extrato | OD | | | [proteína] (µg/mL) final | | | Média | sd | [proteína] (mg/mL) |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------|-----------|-----------|---------|--------|--------------------|
| | Réplica 1 | Réplica 2 | Réplica 3 | Réplica 1 | Réplica 2 | Réplica 3 | | | |
| 1:20 | 0,587 | 0,582 | 0,598 | 2001,43 | 1930,00 | 2158,57 | 2030,00 | 116,93 | 2,03±0,12 |
| 1:40 | 0,506 | 0,514 | 0,516 | 1688,57 | 1917,14 | 1974,29 | 1860,00 | 151,19 | 1,86±0,15 |
| 1:60 | 0,465 | 0,469 | 0,475 | 1034,29 | 1262,86 | 1605,71 | 1300,95 | 287,61 | 1,30±0,29 |

Como é possível observar na Tabela 3, a concentração obtida no extrato de *Olea europaea* foi de cerca de 2 mg/mL. Não é uma concentração elevada nem a mais adequada para realizar as análises de eletroforese, contudo, o pólen original era natural e continha, para além de pólen, as anteras onde este se encontra reservado, e os estames, estrutura principal da parte reprodutora da árvore. Por esta razão, tornou-se mais difícil extrair uma grande quantidade de pólen, a partir do que se tinha inicialmente.

As técnicas imunológicas foram realizadas em conjunto, na sua maior parte, com a estagiária de licenciatura, Sara Anacleto, que teve como objetivo determinar o perfil eletroforético de *Quercus rotundifolia* e *Quercus ilex*, estudando também a reatividade cruzada em pacientes sensibilizados a *Olea europaea*.

5.1.2. DETERMINAÇÃO DO PERFIL PROTEICO EM FUNÇÃO DO PI

No sentido de determinar o perfil eletroforético do extrato de *Olea europaea* obtido, foram realizadas análises em géis de IEF e SDS-PAGE. Na técnica de IEF, devido à pouca concentração de proteína obtida para o pólen em estudo, não se obtiveram os resultados esperados, havendo apenas alguns géis com a revelação de algumas bandas, em gel de poliacrilamida. Um dos géis encontra-se na Figura 18. Neste gel, para se obter uma melhor definição das bandas, o volume a aplicar foi o dobro do normal usado (2µL), aguardando-se, entre cada aplicação, 5 minutos para o gel conseguir absorver a maior parte do volume.

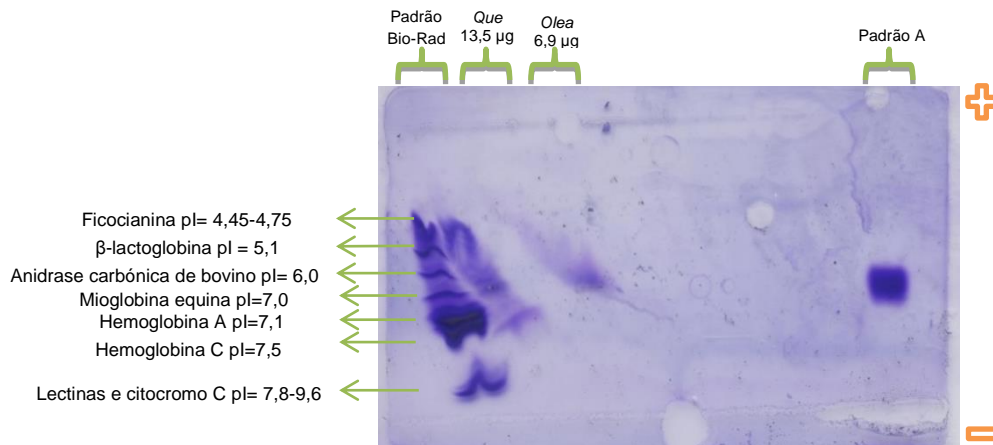


FIGURA 18 - Gel de poliacrilamida obtido com aplicação de amostras de *Olea europaea* e *Quercus* e dois padrões diferentes aplicados. As bandas correspondentes para o padrão da Bio-Rad estão sinalizadas na figura.

Como é possível observar na Figura 18, houve separação dos constituintes dos pólenes em estudo embora a corrida eletroforética em si tenha provocado um deslocamento das bandas (devido a bolhas no gel) para o lado esquerdo o que impossibilitou uma correta análise. O padrão da Bio-Rad apresenta, visivelmente, uma melhor definição de bandas, tendo existido uma boa separação deste, ao contrário do padrão A usualmente utilizado. Apesar da separação do extrato de *Olea*, não é possível definir nenhuma banda em concreto. Os resultados obtidos com outros géis de IEF não tiveram alterações em relação a este, pelo que se decidiu prosseguir para a técnica de SDS-PAGE e posterior utilização dos géis obtidos em IEF para realização de Western Blot.

5.1.3. DETERMINAÇÃO DO PERFIL PROTEICO EM FUNÇÃO DA MASSA MOLECULAR

Para a realização da técnica de SDS-PAGE e determinação do perfil proteico do extrato de *Olea europaea* uma alíquota do extrato foi diluída em 200 µL de água destilada e foi aplicada no gel de SDS, como é apresentado na Figura 19.

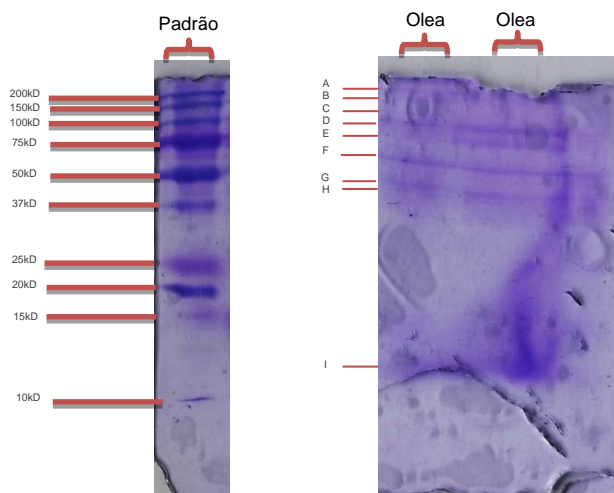


FIGURA 19 - Perfil proteico de *Olea europaea*. Comparação das bandas visíveis com padrão aplicado no gel e respetivas bandas visíveis de *Olea* identificadas pelas letras de A a H. Foram aplicadas duas amostras do extrato de *Olea europaea* no gel, visíveis na figura.

Neste gel é possível observar-se com mais clareza o perfil proteico do extrato de *Olea*, ao contrário dos resultados nos géis de IEF. Através do padrão foi possível então determinar, por interpolação no gráfico Distância Vs log MM (ANEXO 2), as massas moleculares relativas das bandas identificadas no gel para o extrato em estudo (Tabela 4).

TABELA 4 - Valores de massas moleculares relativas para o extrato de *Olea europaea*, de acordo com o gel de SDS-PAGE obtido na Figura 18. Os valores de massa molecular foram obtidos através da interpolação da reta Distância Vs log MM construída a partir dos valores de massa molecular das bandas obtidas no padrão, colocado no mesmo gel.

| Amostra <i>Olea europaea</i> | | |
|------------------------------|--------|-------|
| distância (cm) | log MM | MM |
| 0,5 | 2,0114 | 102,7 |
| 0,7 | 1,9824 | 96,0 |
| 1,2 | 1,9099 | 81,3 |
| 2 | 1,7939 | 62,2 |
| 2,6 | 1,7069 | 50,9 |
| 2,9 | 1,6634 | 46,1 |
| 7,1 | 1,0544 | 11,3 |

Neste gel de SDS a amostra foi aplicada sem realizar qualquer diluição, devido ao facto de já existir uma pequena quantidade de proteína no extrato, já referido anteriormente. É possível obter, pela análise do gel, sete bandas distintas, em que os respetivos valores de massas moleculares se encontram na Tabela 4. Comparando os resultados obtidos com a Figura 4, realizada no estudo de (Carnés & Fernández-Caldas, 2002), pode-se concluir que existe uma proximidade com os resultados já publicados. As bandas com maior massa molecular (40 – 100kDa), resultante das proteínas ainda não estudadas, obtidas no gel estão também apresentadas na Figura 2. A única banda que se conhece dentro desta zona encontra-se bem definida no gel obtido no estudo, com uma massa molecular relativa de 46,1 kDa, correspondente ao alergénio *Ole* e 9. Entre a zona de massas moleculares de 30kDa a 10kDa é notório um arrasamento de proteínas, contudo não é possível definir com clareza nenhuma banda, exceto a referida na Tabela 4, com uma massa molecular relativa de 11,3 kDa, correspondente provavelmente ao alergénio *Ole*

e 6. Este arrastamento também é visível na Figura 2, o que se deve provavelmente ao facto de os alergénios pertencentes à *Olea europaea* estarem presentes maioritariamente nesta zona.

5.1.4. WESTERN BLOT E ALERGOGRAMAS OBTIDOS PARA EXTRAÇÃO DE PÓLEN

De modo a avaliar a sensibilização dos pacientes utilizados no estudo, realizou-se a separação das proteínas, quer do extrato do *Olea europaea* quer de *Quercus rotundifolia*, pela técnica de SDS para posterior transferência para membrana de PVDF.

Na Figura 20 é apresentada uma membrana após incubação em solução de Ponceau S, onde é possível observar as bandas obtidas em SDS-PAGE.

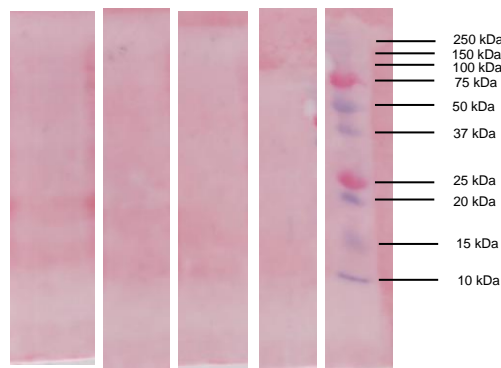


FIGURA 20 - Imagem de uma membrana de PVDF após incubação em solução de Ponceau S, a partir de gel de SDS-PAGE. Foram adicionados no gel amostras de extratos de *Olea europaea*. Na figura estão sinalizadas as massas moleculares relativas às bandas do padrão utilizado.

A mesma membrana foi utilizada de seguida para avaliar a sensibilização dos pacientes. A membrana foi cortada em tiras e estas foram incubadas com diferentes soros (PC 203 34446, PC 201 07207, PC 204 39983 e PC 203 98986) diluídos 1:50. Os resultados estão representados e analisados na Figura 21.

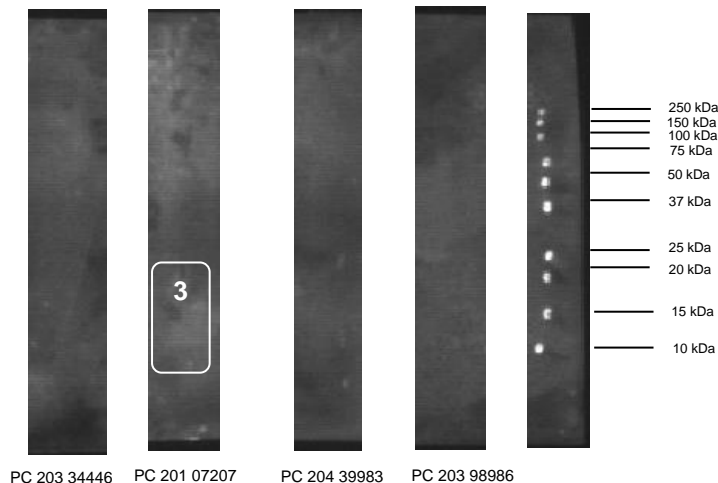


FIGURA 21 – Imagem da revelação da membrana de Western Blot. A membrana foi cortada em quatro tiras distintas, cada uma com uma lane de *Olea europaea*, em que cada tira foi incubada com um soro diferente, indicado na figura.

É possível verificar pela Figura 21 que, para a *Olea europaea*, apenas foi visível uma banda imunorreativa para um soro (PC 201 07207), com uma massa molecular de 19,01 (banda nº3, lane 5)

A fraca visualização das bandas nesta primeira transferência realizada pode ter-se devido à quantidade de soro que foi incubada. Sendo assim, nas seguintes experiências as membranas foram incubadas em soros diluídos apenas 1:20, o que se revelou uma mudança positiva, sendo que a partir desta mudança se observaram com mais clareza as bandas obtidas. Uma outra técnica que se realizou de forma a tentar obter um maior número de bandas imunorreativas foi a realização do *stripping* das membranas, ou seja, as membranas foram remarcadas e novamente sensibilizadas com o mesmo soro. Na Tabela 5 estão apresentadas todas as bandas obtidas, incubados nos respetivos soros, que mostraram ser imunorreativos para a *Olea europaea* e respetiva correspondência com os alergénios conhecidos para a *Olea*.

TABELA 5 - Soros reativos e respetivas bandas obtidas pela membrana de Western Blot. As membranas foram marcadas três vezes utilizando a técnica de *stripping*, o que permitiu a visualização de mais bandas reativas para cada soro reativo. Na última coluna encontra-se a possível correspondência com os alergénios conhecidos de *Olea europaea*.

| Soros | Marcação | | | Possível correspondência aos alergénios de <i>Olea</i> |
|--------------|----------------|-------------------------|----------------|---|
| | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | |
| PC 201 07207 | 11,67 | - | - | Ole e 6, Ole e 7 e Ole e 10 |
| PC 201 35886 | - | - | 65,52* | - |
| PC 201 37077 | | 10,84 25,54 75,00 | | Ole e 6, Ole e 7 e Ole e 10 Ole e 1, Ole e 8 - |
| PC 207 73122 | - | - | - | - |
| PC 202 47579 | - | 32,24 | 136,57* | Ole e 4 |
| PC 203 34446 | - | 28,39 31,56 | - | Ole e 1, Ole e 8 Ole e 4 |
| PC 203 86963 | - | 33,99 | 23,21 | Ole e 4, Ole e 13 |
| PC 203 98986 | - | 36,61 | 12,51 | Ole e 4 / Ole e 6, Ole e 7 e Ole e 10 |
| PC 204 39983 | | 8,16 27,79 | 13,32 30,41 | Ole e 3, Ole e 6, Ole e 7 e Ole e 10 Ole e 1, Ole e 8, Ole e 4 |

* sem correspondência com alergénios conhecidos.

Apesar dos resultados pouco claros para os géis de IEF, realizaram-se transferências usando como base os géis, não corando os mesmos e realizando todo o procedimento adequado, já referido anteriormente.

Na Figura 21 é apresentado uma membrana de PVDF em que as amostras foram transferidas a partir de um gel de IEF. Neste gel foi realizada a mesma técnica já referida, onde se aplicou o dobro do volume normalmente usado.

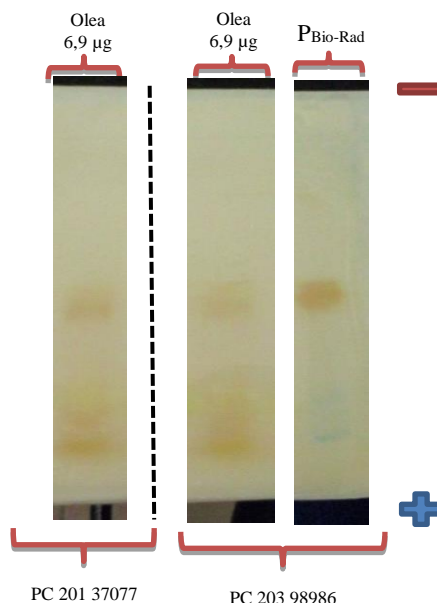


FIGURA 22 – Imagem de uma membrana de PVDF com visível observação de bandas obtidas no gel de SDS-PAGE. No gel foram aplicadas amostras de extrato de *Olea europaea* e *Quercus rotundifolia* com diferentes concentrações, para além de dois padrões distintos. A membrana transferida foi cortada em duas tiras para ser incubada com dois soros, indicados na figura.

Para além de tentar avaliar o pI também se testaram as membranas para imunoreatividade com dois soros selecionados através dos resultados obtidos a partir dos géis de SDS-PAGE (PC 20137077 e PC 203 98986). Os resultados estão apresentados na Figura 23.

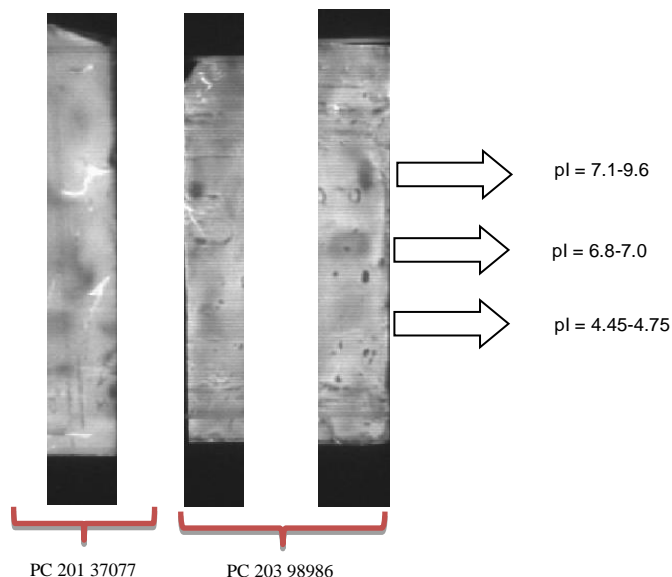


FIGURA 23: Imagem da membrana com amostras de *Quercus rotundifolia* e *Olea europaea* após a revelação. Foram adicionadas várias amostras de cada extrato, com diferentes concentrações para tentar obter um maior número de bandas reativas. A membrana foi dividida em duas tiras para incubação com dois soros distintos (PC 201 37077 e PC 203 98986). As bandas identificadas estão identificadas pelos números de 1 a 10. A imagem ao lado é uma imagem da membrana antes da incubação onde é possível observar com melhor nitidez as bandas relativas ao padrão da Bio-Rad. Os pI's correspondentes às bandas do padrão encontram-se identificados na figura.

Na Figura 22 é possível observar que para a *Olea europaea* se identificaram cinco bandas imunoreativas, três bandas para o soro PC 201 37077 e duas bandas para o soro PC 203 98986,

todas entre o pH 4,3-6. Na Tabela 6 estão apresentados os resultados de pl para as bandas identificadas e possível correspondência com os alergénios conhecidos.

TABELA 6 - Valores de pl correspondentes às bandas imunorreativas obtidas pela membrana da Figura 22. Os números correspondem às bandas reativas com o extrato de *Olea europaea* e ao lado o respetivo pl para cada banda. Na coluna ao lado encontra-se a possível correspondência com os alergénios conhecidos de *Olea europaea*.

| Soro | pl | Correspondência a alergénios de Olea |
|---------------------|----------|--------------------------------------|
| PC 201 37077 | 1 – 4,6 | Ole e 4 |
| | 2 – 4,45 | Ole e 8 |
| | 3 – 4,4 | Ole e 3 |
| PC 203 98986 | 7 – 6,1 | Ole e 1 |
| | 8 – 4,55 | Ole e 8 |

5.2. PARTE II – DESENVOLVIMENTO DO BIOENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA CARGA ALERGÉNICA EM AMOSTRAS

Os resultados obtidos nesta parte, respeitante ao imunoensaio biológico utilizando a cultura celular RBL, foram realizados no Centro de Investigação ZAUM (Zentrum für Allergie und Umwelt), na cidade de Munique, Alemanha.

5.2.1. ESTABELECIMENTO DA CULTURA CELULAR RBL-H21

O estudo iniciou-se em Janeiro do presente ano e o primeiro passo foi descongelar duas alíquotas da linha celular utilizada, RBL, como já foi referido anteriormente no ponto da Metodologia (4.1.6). As alíquotas tinham sido congeladas em 2009 e 2010 encontrando-se preservadas em azoto líquido.

Passadas as primeiras quatro semanas em que foram feitas passagens, diluindo as células na proporção 1:10 após centrifugação e ressuspensão das mesmas, realizou-se o primeiro imunoensaio. O objetivo deste primeiro ensaio foi o de verificar a função das células no que diz respeito à libertação de grânulos secretores. Neste passo não foram usados soros mas sim IgE purificada no intervalo de concentrações 0,01 e 3,162µg/mL para sensibilizar as células sendo a desgranulação induzida com Anti-IgE. Contudo, não se observou libertação de β-hexosaminidase induzida pelo estímulo, mesmo após lise das células com Triton X-100. Estes resultados sugerem que as células não contêm β-hexosaminidase, ou seja, que não possuem grânulos de secreção.

Uma vez que este resultado não era o expectável, foi necessário verificar todos os passos do imunoensaio. Sendo assim, no primeiro subtítulo desta primeira parte dos resultados, vão ser mencionados todos os testes e experiências realizadas de modo a otimizar o ensaio no laboratório de Investigação e produzir assim uma lista de verificação a ser usada sempre que algum investigador novo no Centro se inicie no manuseamento destas células e no respetivo ensaio.

5.2.2. CHECK LIST – LISTA DE VERIFICAÇÃO

O primeiro ponto da Check List foi confirmar se a linha celular utilizada até aquele momento era a correta. As células foram cultivadas e preparadas numa placa de cultivo celular de 24 poços e observadas ao SEM, com o objetivo de se compararem as imagens obtidas com imagens antigas obtidas com a mesma linha celular. Este procedimento foi realizado com ajuda da Dra. Ingrid Weichenmeir, no ZAUM. A figura 2 e 25 mostram células obtida por SEM, mostrando a morfologia das mesmas.

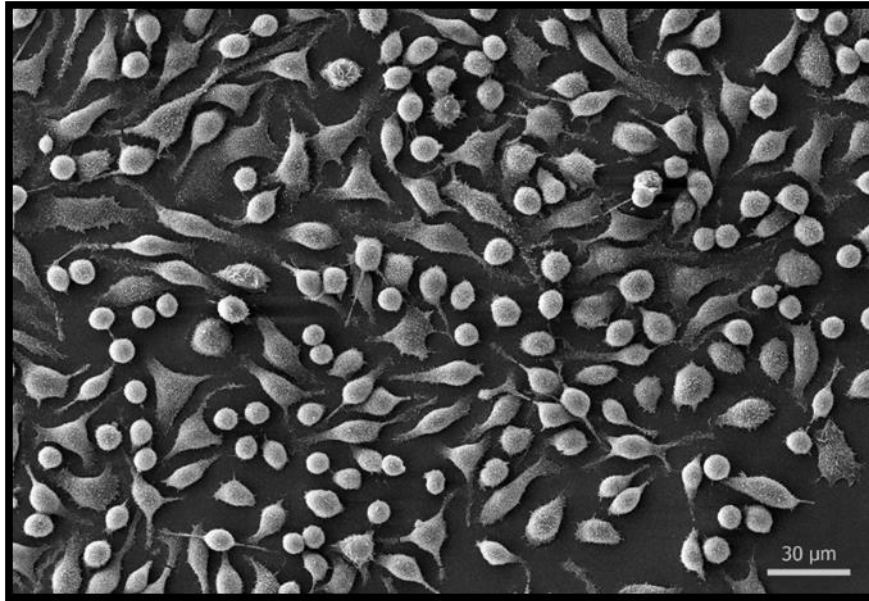


FIGURA 24 - Imagem obtida a partir das células cultivadas, da linha celular RBL-h21, por SEM. As células foram lavadas em tampão PBS e fixadas de modo a poderem ser visualizadas no SEM.

Na Figura 24 é possível observar que as células estão em crescimento, aderentes à placa, algumas em divisão (as redonda) e outras apresentando uma morfologia típica dos basófilos. A superfície dos basófilos encontra-se adequada para aumentar a superfície e a libertação de histamina e β -hexosaminidase.

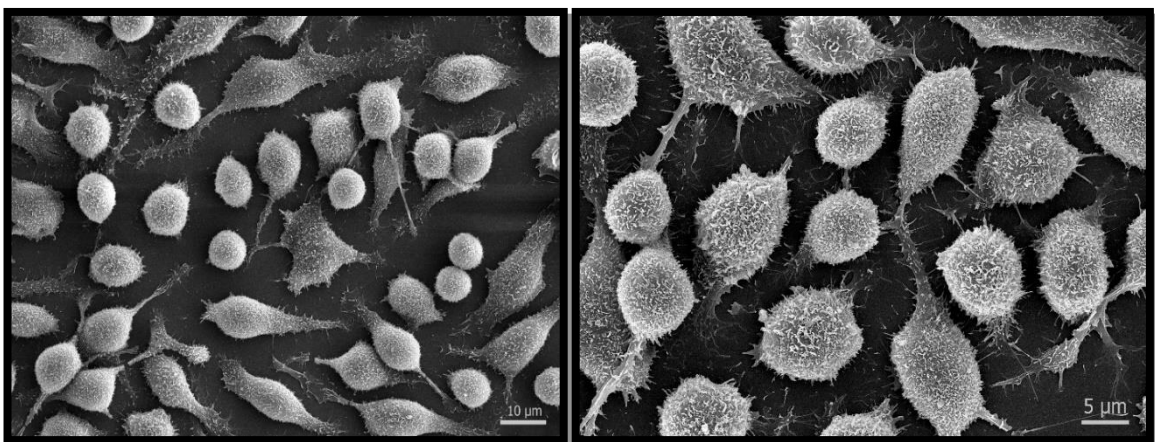


FIGURA 25 - À esquerda, imagem da linha celular obtida por SEM, em 2014 e à direita, imagem obtida com linha celular RBL-h21, em 2010.

Comparando com a imagem da linha celular RBL-h21 obtida em 2010 com a imagem obtida a partir das células descongeladas para o estudo, é possível concluir que apresentam morfologia similar e que o fenótipo das células em questão ainda se encontra nas células recentemente descongeladas, indicando que se trata da mesma linha celular

Depois de saber que as células utilizadas correspondiam à linha celular pretendida, construiu-se a lista de verificação, com todos os problemas que podem acontecer em todos os passos do imunoensaio (Tabela 7).

TABELA 7 - Lista de verificação construída para a realização do imunoensaio de quantificação da libertação de β -hexosaminidase.

| Passos a verificar | O que foi feito para verificar e respetivos resultados |
|---|--|
| As células pertencem à linha celular pretendida (RBL-h21)? | Sim, confirmado pela visualização das células por SEM, e comparação com imagens antigas já obtidas. |
| O meio de cultura utilizado é o correto e está nas condições normais? | Sim. O meio utilizado é o correto e encontra-se dentro da data de uso. |
| Quando se semeia as células na placa de 96 poços, um dia depois, as células estão em crescimento? | A placa pode ser vista ao microscópio eletrónico, observando que as células estão a crescer, preenchem cerca de 80-90% da superfície do poço. Para ter a certeza que as células estão viáveis, em um dos poços com células, adicionou-se solução Azul de Tripano e não se observaram células mortas. |
| A IgE usada no imunoensaio está viável? | A IgE usada é a correta (Fa. Calbiochem #401152). Para ter a certeza que a IgE em stock se encontrava estável, adquiriu-se uma alíquota de IgE nova. |
| A algE usada no imunoensaio está viável? | A algE usada nos ensaios foi aberta quando se iniciou este estudo e é a correta (Anti-Humam-IgE Fa. Dako #A0094). As concentrações usadas no imunoensaio também são as corretas, de acordo com experiências antigas. |
| As soluções tampão e restantes soluções usadas são as corretas? | Todas as soluções foram realizadas de acordo com o protocolo fornecido. |
| É possível que as células estejam sob stress quando são semeadas na placa? | Não. As células semeadas na placa estão no seu processo de divisão normal, sem stress. Quando observadas ao microscópio um dia depois de semeadas nas placas elas encontram-se em crescimento e sem células mortas, como já foi referido. |
| A Placa de 96 poços usada para semear as células é a correta? | Sim, a placa usada é a correta – Fa. Nunc, cat. 167008 (Nunclon Delta Surface). |
| Quando adicionada a solução 1% Triton X-100, acontece a lise das células? | Sim, quando adicionada a solução 1% Triton X-100 e usando a solução de Azul Tripano observa-se que todas as células foram destruídas, ou seja, ocorreu a sua lise. |
| O substrato usado (p-NAG) está correto? | <i>Adicionando p-nitrofenol (dissolvido em H₂O), que corresponde ao produto final do ensaio, em células onde se adicionou 1% Triton X-100, depois da experiência normal, é esperado que se observe a cor amarela. Este é o sinal de que as células estão a libertar β-hexosaminidase mas algo está errado no ensaio.</i> |
| Estão as células a libertar β -hexosaminidase? | Nesta experiência foi realizado o teste com as células semeadas na placa de 96 poços, um dia antes, e com uma suspensão de células que foi passada no dia da experiência. Em todas as células em que se adicionou p-nitrofenol observou-se a mudança de cor da suspensão para a cor amarela, mas, mesmo usando a suspensão de células (com alta concentração de células), não foi observada uma cor muito intensa. Usando uma diferente solução Stop, com e sem p-nitrofenol, e esperando uma hora depois de adicionar a solução de p-NAG, no banho termostaticado, a cor amarela foi observada com mais intensidade neste teste. |

Pela primeira vez, depois de completar toda a lista de verificação, observou-se uma nítida coloração amarela, resultante da produção da p-nitrofenol por ação da β -hexosaminidase. Pôde-se concluir que o possível problema estaria na solução “Stop” usada anteriormente. Foram então realizadas todas as modificações necessárias no protocolo anteriormente utilizado e adicionaram-se mais informações específicas sobre cada solução a usar no ensaio e com o cuidado de referir o pH necessário para cada solução, de modo a não causar instabilidade nas células. O pH é um fator muito importante nestes ensaios biológicos, já que pode afetar nitidamente a função celular. Este parâmetro deve ser mantido a, cerca de 7, pois fora desta zona de pH as células encontram-se em *stress*, não respondendo da mesma forma aos estímulos.

5.2.3. OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO E SELEÇÃO DO LOTE DE CÉLULAS

Após confirmação de libertação de β -hexosaminidase pelas células, os primeiros ensaios foram realizados estimulando apenas IgE e Anti-IgE de modo a analisar a capacidade das células no momento, no que diz respeito à libertação de β -hexosaminidase. A figura 25 mostra uma curva dose-resposta da desgranulação em função de algE com uma forma de sino. Observa-se um aumento de desgranulação em resposta a concentrações ausentes de algE no intervalo 0,2-0,00027 ng/mL seguido de uma diminuição para valores superiores.

TABELA 8 - Resultados do ensaio de libertação de β -hexosaminidase obtida em células da linha celular RBL-h21: valores de OD para as células sensibilizadas com IgE e anti-IgE, sua respetiva percentagem de libertação de β -hexosaminidase e respetivos valores para os controlos do ensaio.

| [Anti-IgE], mg/mL | IgE+algE OD | % Libertação β -hexosaminidase | Controlos | OD | % Libertação β -hexosaminidase |
|-------------------|-------------|--------------------------------------|-------------------|-------|--------------------------------------|
| 0,20000 | 0,369 | 14,072 | Espontânea | 0,151 | 8,482 |
| 0,06667 | 0,413 | 16,781 | Total | 1,774 | 91,518 |
| 0,02222 | 0,42 | 17,212 | IgE-K | 0,141 | -0,564 |
| 0,00741 | 0,391 | 15,426 | | | |
| 0,00247 | 0,358 | 13,394 | | | |
| 0,00082 | 0,299 | 9,761 | | | |
| 0,00027 | 0,223 | 5,081 | | | |

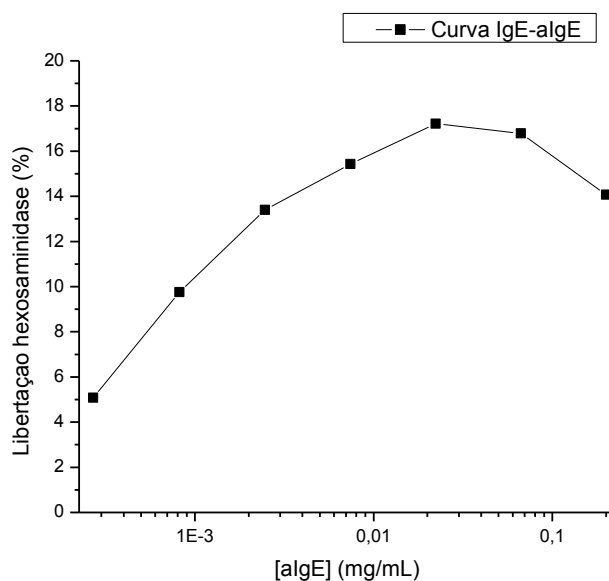


FIGURA 26 - Curva de estimulação de IgE-algE. Libertação de β -hexosaminidase em células da cultura celular RBL-h21, determinada através do imunoenensaio biológico.

Apesar da boa curva IgE-algE obtida no ensaio representado na Figura 26, os resultados obtidos ainda estão abaixo dos valores usualmente obtidos, o que pode ser visível pela liberação máxima atingido um valor de 20% inferior ao descrito na literatura (Vogel, Lüttkopf, Hatahet, Haustein, & Vieths, 2005).

Estes resultados foram os melhores obtidos com este lote de células.

Nos ensaios seguintes preparam-se novas soluções tampão (tampão de diluição, de lavagem e tampão “Stop”) e estudou-se a liberação total de β -hexosaminidase, observando-se que os resultados melhoraram significativamente (Figura 27). Os valores de liberação total de β -hexosaminidase são agora comparáveis aos resultados de laboratório anteriormente obtidos noutros trabalhos não publicados.

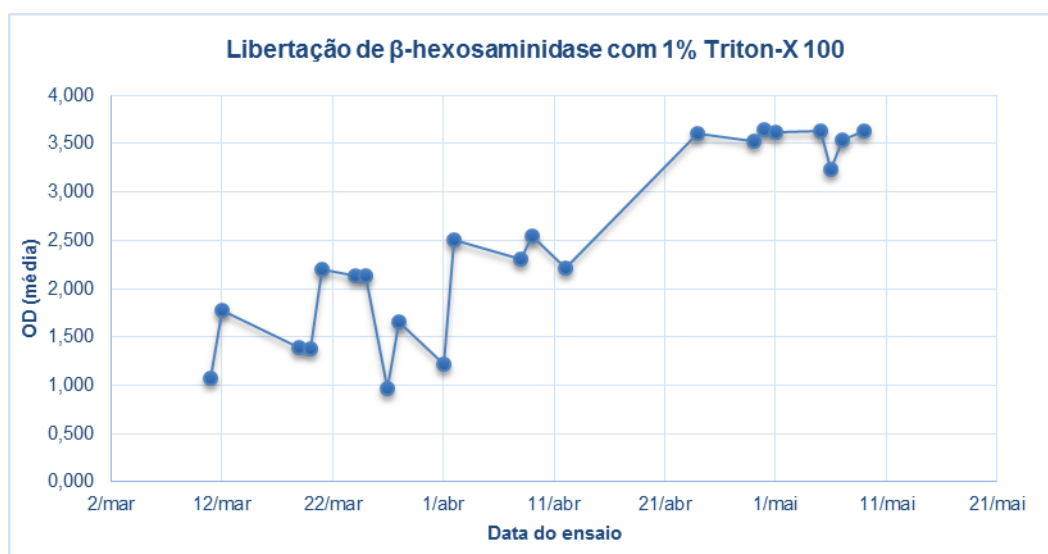


FIGURA 27 - Valores de médias de OD's obtidas nos ensaios entre março e maio, nas células da cultura celular RBL-h21, onde se adicionou 1% de Triton x-100, correspondente à liberação total de β -hexosaminidase pelas células

Tendo em conta os resultados, testou-se uma alíquota de células preservadas desde 2007 e procurou-se perceber se as células estavam a perder atividade ou se a especificidade das mesmas estava comprometida. Decidiu-se realizar uma análise FACS com o objetivo de determinar a percentagem de células que expressam o recetor FcεRI.

O próximo passo foi verificar se o recetor FcεRI ainda se encontrava nas células nos diferentes lotes em cultura. Se o recetor não se encontrar nas células a IgE e a Anti-IgE usadas no ensaio não se ligam às células pois estes são específicos para os recetores humanos e a linha celular utilizada é proveniente de basófilos de ratos que apenas foram modificados para expressar o recetor humano para a IgE (FcεRI).

O objetivo foi verificar a percentagem de células que expressavam o recetor para a IgE humana, nomeadamente a subunidade alfa (α-FcεRI).

A identificação da expressão do recetor foi processada de acordo com o procedimento em (Vogel, Lüttkopf, Hatahet, Haustein, & Vieths, 2005). Depois de selecionar os basófilos, usou-se o fluorocromo AmCyan para marcar entre as células viáveis e não viáveis e o APC-A para marcar os basófilos com o α-FcεRI, que tinham sido incubadas anteriormente com IgE específica. Os resultados estão apresentados nas Figuras 28, 29 e 30.

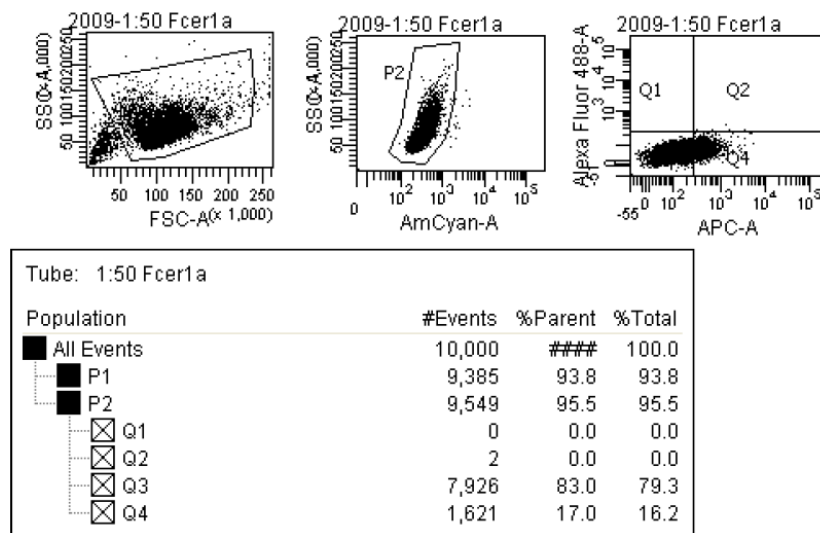


FIGURA 28 - Análise FACS das células congeladas em 2009 (Diluição 1:50), para identificação de células RBL-h21 que expressam o αFcεRI. O quadrante 4 (Q4) representa a percentagem de células analisadas durante a análise que expressam o recetor específicos para a IgE humana.

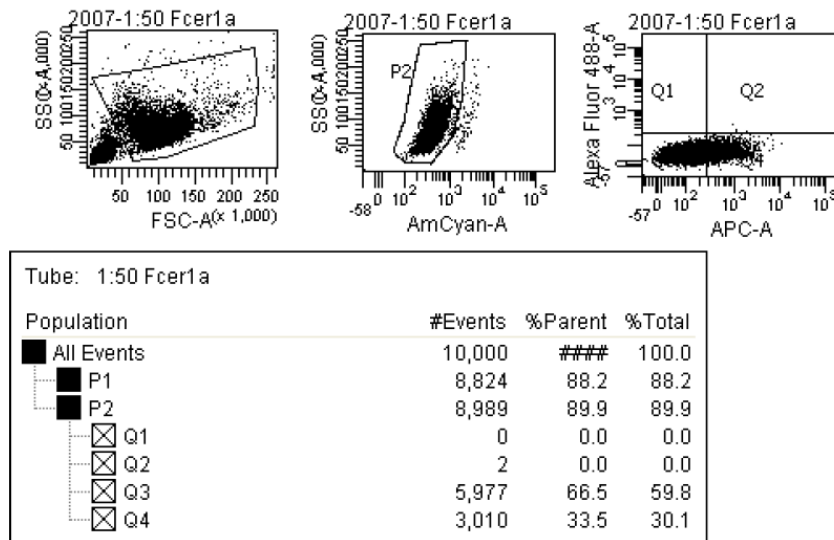


FIGURA 29 - Análise FACS das células congeladas em 2007 (Diluição 1:50), para identificação de células RBL-h21 que expressam o α Fc ϵ RI. O quadrante 4 (Q4) representa a percentagem de células analisadas durante a análise que expressam o recetor específicos para a IgE humana.

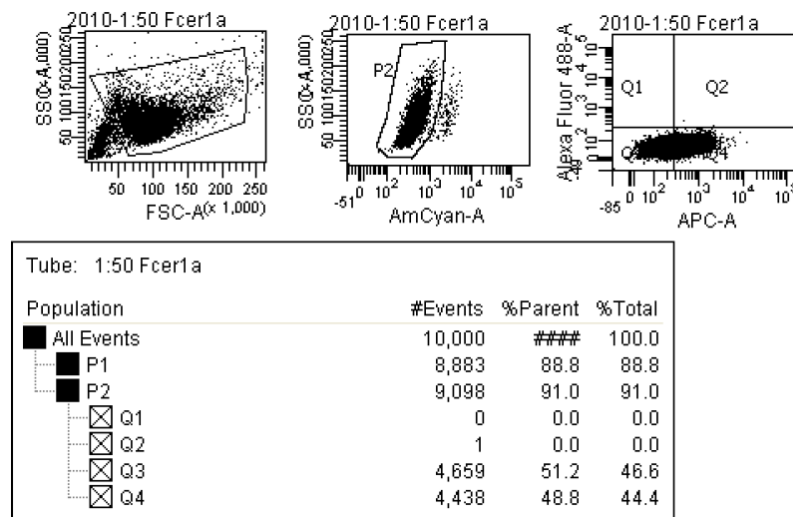


FIGURA 30 - Análise FACS das células congeladas em 2010 (Diluição 1:50), para identificação de células RBL-h21 que expressam o α Fc ϵ RI. O quadrante 4 (Q4) representa a percentagem de células analisadas durante a análise que expressam o recetor específicos para a IgE humana.

Nas figuras acima apresentadas é observado, na primeira janela de identificação a seleção das células, na segunda janela a seleção das células viáveis e na terceira a seleção dos basófilos que expressam o recetor alfa para a IgE humana. A tabela inserida em cada imagem mostra o total de eventos percorridos durante o ensaio (células analisadas pelo citómetro de fluxo), em que o quadrante positivo (Q3), contém as células que se pretendem quantificar.

As Figuras 28, 29 e 30 mostram que não há diferenças significativas entre os diferentes lotes celulares no que diz respeito ao recetor Fc ϵ RI.

Nesta análise apenas é possível verificar a presença da cadeia α do Fc ϵ RI por isso, mesmo com melhores resultados nas células de 2009, não é prudente considerar que apenas esta cultura celular se deve utilizar para realizar os imunoenaios. Outra questão é o facto de as células de 2007 apenas terem sido descongeladas três semanas antes de realizar a análise FACS, o que pode

significar que as células ainda não estavam com a atividade máxima e, conseqüentemente, com total especificidade das células para o recetor FcεRI.

Sabe-se que mesmo com níveis baixos de ocupação do FcεRI é o suficiente para induzir uma resposta considerável – mesmo com apenas 1-10% de recetores presentes nos basófilos e mastócitos, existe libertação dos mediadores.

Assim, após esta análise os imunoenaios foram efetuados com os três lotes celulares diferentes.

Após estes resultados o passo seguinte foi então otimizar a concentração de IgE e Anti-IgE a usar de modo a ter os melhores resultados, antes de iniciar a análise dos soros dos pacientes.

5.2.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IgE PARA A SENSIBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS

A utilização de IgE, em particular tratando-se de soros de pacientes alérgicos, implica a titulação de IgE para perceber qual a melhor concentração a usar no imunoensaio. A IgE foi preparada em seis diferentes concentrações (de 0,1 a 3,16µg/mL). Na Tabela 9, tem-se como exemplo os resultados obtidos para a IgE comercial na concentração de IgE de 1µg/mL.

TABELA 9 - Resultados do ensaio de libertação de β-hexosaminidase obtida em células da linha celular RBL-h21: valores de OD para as células sensibilizadas com IgE (c=1µg/mL) e anti-IgE, sua respetiva percentagem de libertação de β-hexosaminidase e respetivos valores para os controlos do ensaio.

| [Anti-IgE], mg/mL | IgE+algE | | % Libertação β- hexosaminidase | Controlos | OD | % Libertação β- hexosaminidase |
|----------------------|----------|-------|-----------------------------------|-------------------|-------|-----------------------------------|
| | OD 1 | OD 2 | | | | |
| 0,20000 | 0,352 | 0,358 | 8,638 | Espontânea | 0,104 | 2,932 |
| 0,06667 | 0,455 | 0,480 | 11,921 | Total | 3,530 | 97,068 |
| 0,02222 | 0,514 | 0,636 | 16,838 | IgE-K | 0,059 | -1,299 |
| 0,00741 | 0,496 | 0,623 | 16,458 | | | |
| 0,00247 | 0,391 | 0,467 | 10,797 | | | |
| 0,00082 | 0,200 | 0,238 | 4,669 | | | |
| 0,00027 | 0,086 | 0,125 | 1,357 | | | |

A Figura 31 mostra as curvas dose resposta obtida após titulação de IgE e Anti-IgE para os lotes de 2007 (a) e 2009 (b), onde é possível observar que ocorre o aumento de concentração de IgE catalisada para sensibilizar as células corresponde um aumento da amplitude da curva dose-resposta.

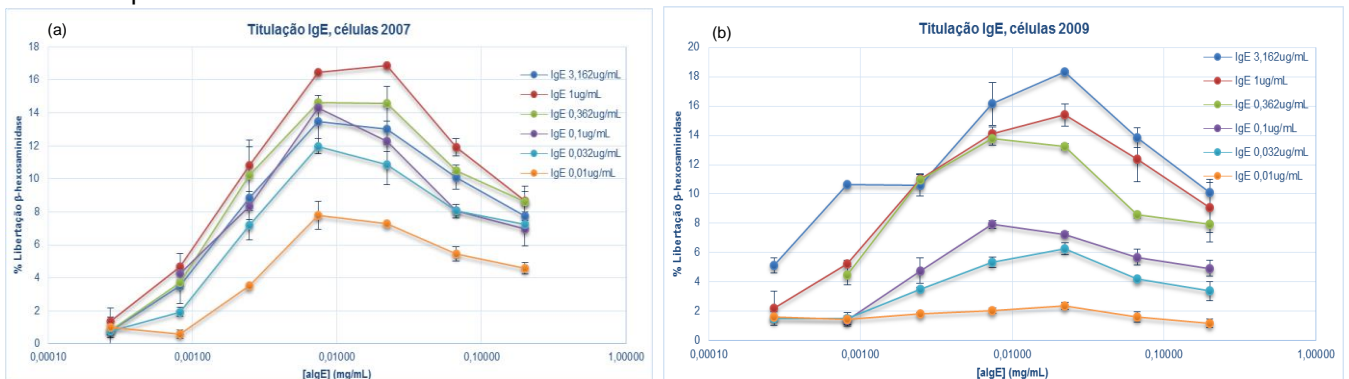


FIGURA 31 – Curva de estimulação IgE-algE, em células da cultura celular RBL-h21 do ano de 2007 (a) e 2009 (b), para determinação da libertação de β-hexosaminidase. Titulação da IgE para otimização do imunoensaio. As células foram estimuladas com diferentes concentrações de IgE e diferentes concentrações de algE, usadas normalmente para construção da curva, de modo a encontrar a concentração ideal de IgE a utilizar no imunoensaio.

O lote 2007 (Figura 31 a) exibiu desgranulação para todas as concentrações de IgE testadas, tendo-se observado desgranulação máxima para 1µg/mL, enquanto que para o lote de 2009 (Figura 30 b) a concentração de 0,01µg/mL de IgE não induziu libertação de vesículas e o valor máximo de desgranulação se atingiu para a concentração de IgE de 3,16µg/mL, significativamente diferente da curva obtida com 1µg/mL de IgE.

Os resultados utilizando células de 2007 e 2009 mostram ainda que as diferenças entre os lotes não foram significativas, sendo possível concluir que as concentrações ótimas para realizar a experiência se situam no intervalo 0,362 µg/mL e 1 µg/mL. É de realçar que parece não haver diferenças significativas entre “batches” de células sensibilizadas com 0,10; 0,36 ou 1,00µg/mL de IgE (Figura 32)

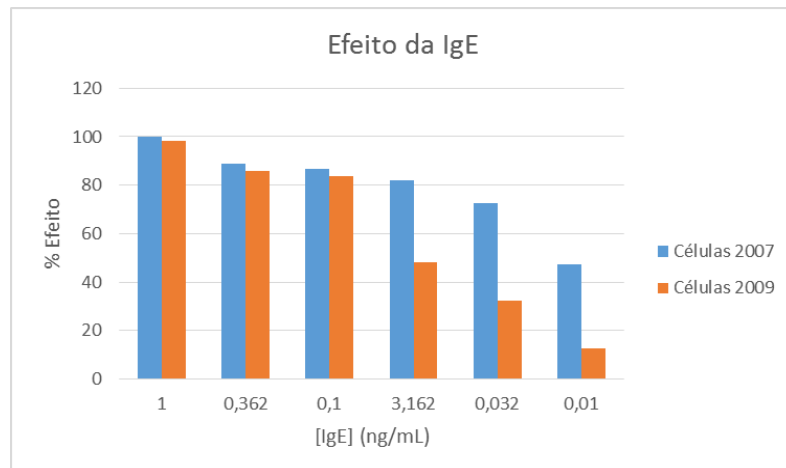


FIGURA 32 - Percentagem do efeito da IgE para as células de 2007 e 2009, na concentração de anti-IgE de 0,00741mg/ml

Foram repetidos os ensaios utilizando concentrações de IgE no intervalo 0,1 a1µg/mL para verificar os resultados anteriores e avaliar a reprodutibilidade do ensaio (Figura 33). Os resultados obtidos mostram que não há diferenças significativas na sensibilização das células no intervalo 0,16-0,32µg/mL havendo uma tendência para diminuição da resposta a 0,36 e 1µg/mL de IgE. Em estudos anteriores, a diluição usada foi de 0,16 µg/mL.

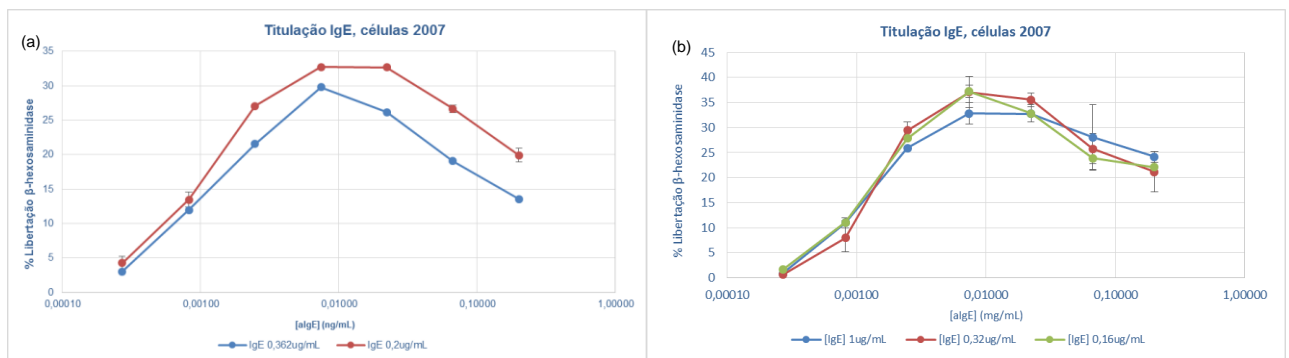


FIGURA 33 – Curva de estimulação de IgE-anti-IgE, em células da cultura celular RBL-h21, do ano de 2007, para determinação da libertação de β-hexosaminidase. Titulação de IgE para otimização do imunoensaio. As células foram estimuladas com duas diferentes concentrações ótimas de IgE (0,362µg/mL e 0,2µg/mL) na figura A e com três diferentes concentrações ótimas de IgE (1 µg/mL; 0,362µg/mL e 0,16µg/mL) na figura B, obtidas em ensaios anteriores e as diferentes concentrações de algE usadas normalmente para a construção da curva.

5.2.5. TITULAÇÃO DE SORO COM RESPOSTA PELAS CÉLULAS RBL-H21 JÁ CONHECIDA

Depois dos bons resultados com a curva de IgE-*algE*, o último passo antes de sensibilizar as células com os soros dos pacientes da região do Alentejo, foi utilizar um soro, que se sabe que induz uma considerável libertação de β -hexosaminidase, aquando da estimulação com anti-IgE.

O soro utilizado como controlo positivo para verificar a boa atividade das células é proveniente de um paciente de Munique (denominado neste estudo por “CB”), sensível ao alérgénio *Phl p 5*, e que em resultados anteriores induziu na linha celular percentagens máximas de libertação de β -hexosaminidase entre 30 e 40%, na diluição 1:16. Na Figura 34 estão representados os resultados obtidos para as diferentes diluições realizadas do soro do paciente.

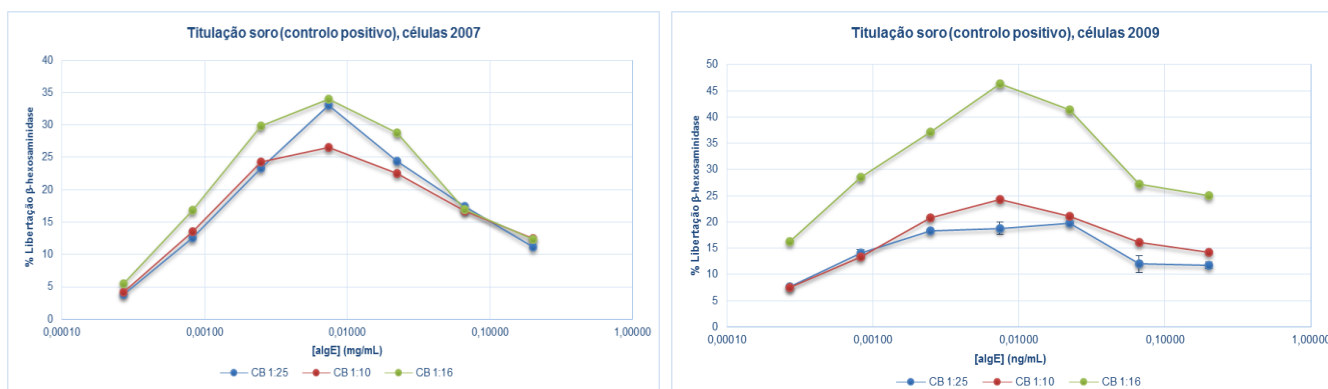


FIGURA 34 – Curva de estimulação IgE-*algE*, em células da cultura celular RBL-h21, do ano de 2007, para determinação da percentagem de libertação de β -hexosaminidase. Titulação do soro utilizado como controlo positivo para o imunoensaio. O soro, proveniente de um paciente de Munique, alérgico a *Phl p5*, foi titulado em três diferentes diluições (1:25, 1:16 e 1:10) com o objetivo de verificar a resposta pelas células.

Como se pode observar pela Figura 34, a ótima diluição do soro do paciente no ensaio foi a de 1:16, com uma percentagem máxima de libertação de 35%. Usando as células do ano de 2009, os resultados de libertação de β -hexosaminidase são ainda mais elevados (máximo de 45% para a diluição 1:16).

Pode-se então concluir que o imunoensaio em si está otimizado, podendo-se dar então início à análise dos soros dos pacientes da região do Alentejo.

5.2.6. LIBERTAÇÃO DE β -HEXOSAMINIDASE EM SOROS DE PACIENTES DA REGIÃO DO ALENTEJO

Como em investigações anteriores, não é fácil encontrar um soro que tenha uma boa libertação de β -hexosaminidase, observável pelo imunoensaio utilizado, mesmo quando o paciente é sintomático e tem um elevado RAST.

Neste estudo, os soros utilizados foram recolhidos a pacientes que frequentam as consultas de imunoalergologia dos Hospitais públicos de Évora e Elvas, e que concordaram em participar no estudo, às proteínas *Ole e 1* e *Ole e 2*. Para cada paciente foram realizados testes cutâneos de Prick modificado às proteínas com relevância. Seguidamente procedeu-se à recolha de soros de

pacientes sensibilizados e que tinham Prick positivo para *Ole e 1*. Esta parte do trabalho foi realizada por técnicos de saúde especializados sob a coordenação da Dra. Luísa Lopes (médica assistente dos doentes). Os dados obtidos no teste de Prick e os soros foram-nos cedidos para análise, tendo havido o cuidado de proteger a identidade dos doentes.

Até ao momento obtiveram-se alguns resultados positivos para três soros diferentes, no que diz respeito à libertação de β -hexosaminidase. Os soros, diluídos previamente, foram estimulados com extratos obtidos pelo Chemvol® instalado na cidade de Évora, do ano de 2011. Os extratos foram escolhidos de modo a que os dias escolhidos apenas tivessem no seu conteúdo polínico o alergénio *Ole e 1*, dados obtidos através da técnica ELISA. Na Figura 36 e nas Tabelas 10 e 11 estão representados os resultados.

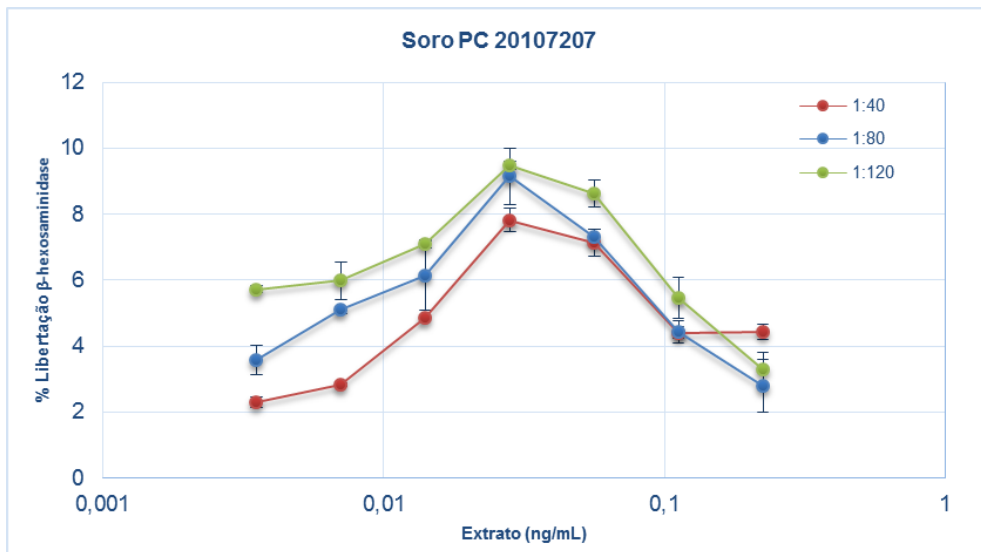


FIGURA 35 - Curva de estimulação de células da cultura celular RBL-h21, para determinação da percentagem de libertação de β -hexosaminidase. Titulação do soro do paciente (PC 20107207), estimulado com extrato obtido do ChemVol®, na cidade de Évora no ano de 2011.

TABELA 10 - Resultados da titulação do soro do paciente (PC 20386963) e respetivos valores obtidos para os controlos do imunoensaio. As células foram estimuladas com extrato obtido do ChemVol®, na cidade de Évora no ano de 2011, em diferentes concentrações.

| PC 20386963 | | | | | |
|-------------------|---------------|--------------|---------------------|-------|--------------|
| Extrato 45XL B | Diluição Soro | | Controlos do Ensaio | | |
| [Ole e 1] (ng/mL) | 1:40 | 1:50 | | OD | % Libertação |
| | % Libertação | % Libertação | Espontânea | 0,292 | 8,023 |
| 9,107 | 12,577 | 10,842 | Total | 3,640 | 91,977 |
| 1,138375 | 11,949 | 6,544 | Soro-Controlo | 0,342 | 1,494 |
| 0,9107 | 32,890 | | | | |
| 0,45535 | 12,696 | | | | |
| 0,303567 | -0,112* | | | | |
| 0,151783 | 0,836 | | | | |

* valor desprezado

TABELA 11 - Resultados da titulação do soro do paciente (PC 20334446) e respetivos valores obtidos para os controlos do imunoensaio. As células foram estimuladas com extrato obtido do ChemVol®, na cidade de Évora no ano de 2011, em diferentes concentrações.

| PC 20334446 | | | | | | | |
|----------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|-------|--------------|
| Extrat8 58XL B | Diluição Soro | | | | Controlos do Ensaio | | |
| [Extrato] (ng/mL) | 1:10 | 1:20 | 1:30 | 1:50 | | OD | % Libertação |
| | % Libertação | % Libertação | % Libertação | % Libertação | Espontânea | 0,292 | 8,023 |
| 2,707 | 13,019 | 10,123 | 7,194 | - | Total | 3,640 | 91,977 |
| 0,338375 | 13,847 | 7,958 | 5,602 | - | Soro-Controlo | 0,498 | 6,154 |
| 0,2707 | 14,834 | 10,950 | 7,130 | - | | | |
| 0,13535 | - | 8,308 | 4,966 | 8,3718 | | | |
| 0,090233 | - | 8,181 | 4,425 | 7,417 | | | |
| 0,045117 | - | 6,653 | 5,825 | 6,112 | | | |
| 0,02707 | - | 8,372 | 11,460 | 6,462 | | | |

Neste trabalho procurou-se estabelecer as bases de uma metodologia que permitisse avaliar a carga alérgica proveniente do pólen de oliveira recorrendo a um biossensor cuja resposta pudesse ser mais representativo da resposta biológica, um aspeto que não é possível avaliar com as metodologias atuais. De facto, a monitorização do pólen, baseada nas contagens polínicas (dados da EAN e Rede Portuguesa de Aerobiologia), ou de alergénios, feita por técnicas de ELISA específicas (Galan, et al., 68(6): 809-12), não são, por si só, representativas do efeito biológico. Ainda que acompanhadas pela monitorização dos sintomas e embora tenha sido observado uma correlação positiva entre os níveis de alergénios e de pólenes (M. Antunes, et al., 2012) estas técnicas não permitem avaliar diretamente a relação entre a dose e a resposta biológica, por um lado, porque a exposição de cada indivíduo é difícil de determinar e, portanto, desconhece-se a dose administrada, e por outro, porque os sintomas são parâmetros individuais e afetados pela subjetividade individual, sendo difícil traduzi-los num parâmetro objetivo.

Um biossensor tem potencialidade de, ao contrário das técnicas atuais, constituir uma aproximação à resposta biológica. Para além disso, um biossensor constitui habitualmente um sistema significativamente mais sensível comparativamente a outros métodos, tendo-se confirmado neste trabalho que os limites de deteção de alergénio foram cerca de 10 vezes menores que o do método ELISA específico para Ole e 1 (cerca de 0,1 e 1, respetivamente; (Carmen Galan, 2013)). De facto, presume-se que a resposta das células seja representativa dos efeitos que ocorrem no ser humano aquando do contacto com os alergénios dispersos no ambiente com as estruturas recetoras, maioritariamente os mastócitos, presentes nas mucosas ou outros tecidos (Vogel, et al., 2005).

O biossensor aqui apresentado, em que as células foram sensibilizadas com IgE de soros humanos, constituiu uma abordagem que tem a vantagem de permitir avaliar de forma direta o efeito dose-resposta e a determinação de valores limiar para desencadear a libertação de mediadores químicos responsáveis pela primeira etapa da resposta inflamatória característica da reação alérgica no ser humano.

6. CONCLUSÃO

O trabalho aqui apresentado permitiu estabelecer as bases para uma metodologia baseada num sensor celular para a determinação da carga alergénica de amostras ambientais.

Em concreto, foram estabelecidas as condições ideais de cultura e sensibilização com IgE humana, presente nos soros de pacientes reativos, da linha celular RBL-h21 e demonstrou-se que, uma vez sensibilizadas, estes basófilos responderam aos alergénios contidos num extrato, com libertação dos grânulos secretores que contêm os mediadores de um modo controlado e de acordo com a dose administrada.

Assim, este biossensor tem potencialidades para vir a constituir uma metodologia relevante para a determinação da carga e/ou atividade alergénica ambiental. Para além disso, poderá ainda contribuir para um avanço significativo, no que respeita ao esclarecimento do efeito dose-resposta e, conseqüentemente, à determinação dos valores limiares que desencadeiam a reação biológica.

Em suma, este conhecimento poderá contribuir para promover o estabelecimento de limites de risco de reação alérgica em parâmetros da qualidade do ar, e assim contribuir para a melhoria da qualidade de vida da população alérgica.

REFERÊNCIAS

- Aalberse, R., Akkerdaas, J., & van Ree, R. (2011). Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy*, *56*, 478-490.
- Akdis, C., & Agache, I. (Edits.). (2014). *Global Atlas of Allergy*. European Academy of Allergy and Clinical Immunology.
- Aronson, N., & Kuranda, M. (1989). Lysosomal degradation of Asn-Linked glycoproteins. *FASEB J.*, *14*, 2615-22.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., & Struhl, K. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc.
- Barsumian, E., Isershky, C., Petrino, M., & Siraganian, R. (1981). IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. *Eur. J. Immunol.*, *11*, 317-323.
- Bennich, H., Ishizaka, S., Rowe, D., Stanworth, D., & Terry, W. (1968). Immunoglobulin E, a new class of human immunoglobulins. *Bull World Health Organ*, *38*, 151-152.
- Buters, J. T., & al., e. (2012). Release of Bet v 1 from birch pollen from 5 European countries. Results from the HIALINE study. *Atmospheric Environment*, *55*.
- Caeiro, E., Ferro, R., Brandao, R. M., Trindade, C., Lopes, M., Gaspar, A., . . . Morais-Almeida, M. (2012). Aerobiologia do pólen de *Olea europaea* L. em Portugal Continental. *Trabalho apresentado em XXXIII Reuniao Anual da SPAIC*. Fátima: Rev. Port. Alergol. Imunol. Clínica.
- Cárdaba, B., Cortegano, I., Florido, F., Arrieta, I., Aceituno, E., del Pozo, V., . . . Lahoz, C. (2000). Genetic restrictions in olive pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol*, *105*(2), 292-298.
- Cariñanos, P., & Casares-Porcel, M. (2011). Urban green zones and related pollen allergy: A review. Some guidelines for designing spaces with low allergy impact. *Landscape and Urban Planning*, *101*(3), 205-214.
- Carmen Galan, C. A.-M. (2013). Airborne olive pollen counts are not representative of exposure to the major olive allergen Ole e 1. *Allergy*, *68*(6), 809-12.
- Carnés, J., & Fernández-Caldas, E. (2002). Ole e 4 and Ole e 5, important allergens of *Olea europaea*. *Allergy*, *57*, Suppl. 71, 24-28.
- Célia M. Antunes, J. M. (2012). Estudo da Sensibilização às Proteínas do Phleum e *Olea* em Doentes com Doença Alérgica Respiratória Sazonal no Alentejo. *Rev. Port. Alergol. Imunol. Clínica*, *20* (Supl. 1), 47.
- COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP). (2008). GUIDELINE ON ALLERGEN PRODUCTS: PRODUCTION AND QUALITY ISSUES. London.
- Diamantino, C., Caeiro, E., Martins, L., Almeida, F., & Lopes, M. (2006). Sensibilização aos pólenes em crianças com idade inferior a 8 anos. *Rev Port Imunoalergologia*, *14* (3), 245-249.
- Featuring Thermo Scientific SuperSignal Substrates and Pierce Western Blotting Accessories. (2009). *Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide*. Thermo Fisher Scientific Inc.
- Galan, C., Antunes, C., Brandao, R., Torres, C., Garzia-Mozo, H., Caeiro, E., . . . T.M. Buters, J. (68(6): 809-12). Airborne olive pollen counts are not representative of exposure to the major olive allergen Ole e 1. *Allergy*.

- Goldstein, B., & Dembo, M. (1982). The On and Off of Human Allergies. *Los Alamos Science*, 6, 20-41.
- González, E. M., Villalba, M., Quiralte, J., Batanero, E., Roncal, F., Albar, J. P., & Rodríguez, R. (2006). Analysis of IgE and IgG B-Cell immunodominant regions of Ole e 1, the main allergen from olive pollen. *Molecular Immunology*, 43, 570-578.
- Gutiérrez Bustillo, Adela M. Ficha de Olivo (2011), <http://alcoi.san.gva.es/alercoy/fichas/Olea/Olivo-Olea.pdf> (última vez visitado a 01.09.2014)
- Ishizaka, K., & Ishizaka, T. (1967). Identification of γ -E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol*, 99, 1187.
- Kindt, T., Osborne, B., & Goldsby, R. (2006). *Kuby Immunology* (6th ed.). W. H. Freeman & Company.
- Knox, B., & SupNegiu, C. (May de 1996). Environmental and Molecular Biology of Pollen Allergens. *Trends in Plant Science*, 1(5), 157-163.
- Larché, M. (2007). Regulatory T cells in Allergy and Asthma. *CHEST Translating Basic Research Into Clinical Practice*, 132 (3), 1007-1014.
- Larché, M. (2007). Regulatory T Cells in Allergy and Asthma. *Chest*, 132 (3): 1007-1014.
- Larché, M., Akdis, C., & Valenta, R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 6, 761-771.
- Loureiro, G., Rabaça, M., Blanco, B., Andrade, S., Chieira, C., & Pereira, C. (2005). Aeroallergens sensitization in an allergic paediatric population of Cova da Beira, Portugal. *Allergol et Immunopathol*, 33 (4), 192-8.
- Lourenço, O., Fonseca, A., & Taborda-Barata, L. (2007). Demographic, laboratory and clinical characterisation of adult portugues asthmatic patients. *Allergologia et Immunopathologia*, 35 (2).
- Lucas, F. (2010). *Células T reguladoras na Asma experimental - Tese de Pós-Graduação*. São Paulo.
- M. Antunes, C., M. Moreira, J., Caeiro, E., Ferro, R., Coelho, C., Brandão, R., & Lopes, L. (2012). Estudo da sensibilização às proteínas do Phleum e Olea em doentes com doença alérgica respiratória sazonal no Alentejo. *Rev. Port. Alergol. Imunol. Clínica*, 20 (supl. 1):47.
- MacGlashan, JR., D. (2005). IgE and FcERI REgulation. *Annals New York Academy of Sciences*, 1050, 73-88.
- ProteinTech*. (10 de Janeiro de 2015). Obtido de ProteinTech: <http://www.ptglab.com/Support/TechnicalSupport/LearningCenter/AntibodyBasics.aspx>
- Puc, M. (2003). Characterization of pollen allergens. *Ann Agric. Environm. Med.*, 40, 143-49.
- Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., González, E., Monsalve, R., Huecas, S., . . . Ledesma, A. (2002). Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy*, 57, Suppl 71, 6-16.
- Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Palomares, O., & Salamanca, G. (2007). Emerging pollen allergens. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61, 1-7.
- Rosado Pinto, José Eduardo., WAO/EAACI DEFINIÇÕES EM ALERGIA, 2004, <http://www.eaaci.org/resources/allergy-glossary.html> (última vez visitado a 10.01.2015)

- Sánchez Mesa, J., Brandao, R., Lopes, L., & Galan, C. (2005). Correlation between pollen counts and symptoms in two different areas of the Iberian Peninsula: Cordoba (Spain) and Evora (Portugal). *J Invest Allergol Clin Immunol*, 15 (2), 112-116.
- Scientific, T. (2009). Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide. *Thermo Fisher Scientific*.
- Smith, E. (2000). *Sampling and Identifying Allergenic Pollens and Molds. An Illustrated Identification Manual for Air Samples*. San Antonio, Texas: Blewstone Press.
- Sofiev, M., & Bergmann, K.-C. (2013). *Allergenic Pollen - A Review of the Production, Release, Distribution and Health Impacts*. Springer.
- Stanworth, D., Humphrey, J., Bennich, H., & Johansson, S. (1967). Specific inhibition of the Praunitz-Küstner reaction by an atypical human myeloma protein. *Lancet*, 2, 330-332.
- Stone, K., Prussin, C., & Metcalfe, D. (2010). IgE's, mast cells, basophils and eosinophils. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2, Supplement 2), S73-S80.
- Tavares, B., Machado, D., Loureiro, G., Cemlyn-Jones, J., & Pereira, C. (2008). Sensitization to profilin in the Central region of Portugal. *Science of the Total Environment*, 273-278.
- Thibaudon, M., Sikoparija, B., Oliver, G., Smith, M., & A. Skjoth, C. (2014). Ragweed pollen source inventory for France - The second largest centre of Ambrosia in Europe. *Atmospheric Environment*, 83, 62-71.
- Twaroch, T. E., Focke, M., Civaj, V., Weber, M., Balic, N., Mari, A., . . . Valenta, R. (2011). Carrier-bound nonallergenic Ole e 1 peptides for vaccination against olive pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 128, 178-184.e7.
- Valenta, R., & Kraft, D. (2002). From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, 14, 718-27.
- Villalba, M., Batanero, E., López Otín, C., & et al. (1993). The amino acid sequence of Ole e 1, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur J Biochem*, 216, 863-869.
- Villalba, M., Rodríguez, R., & Batanero, E. (2014). The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment. *Methods*, 66, 44-54.
- Vogel, L., Lüttkopf, D., Hatahet, L., Haustein, D., & Vieths, S. (2005). Development of a functional in vitro assay as a novel tool for the standardization of allergen extracts in the human system. *Allergy*, 60, 1021-1028.
- Wachholz, P., Soni, N., Till, S., & Durham, S. (2003). Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 915-922.
- Weber, R. (2003). Patterns of pollen cross-allergenicity. *J Allergy Clin Immunol*, 112(2), 229-239.
- Zaia, D., Zaia, C., & Lichtig, J. (1998). Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, 6, 787-793.

ANEXOS

ANEXO I – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PROTEÍNA

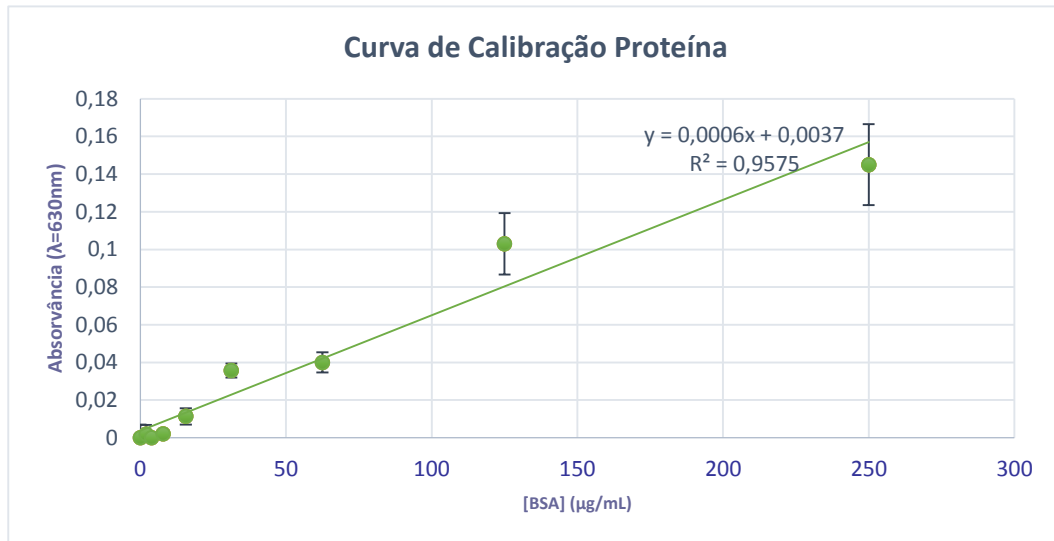


FIGURA 36 – Curva de calibração de proteína. A determinação de proteína foi realizada pelo método de Bradford, utilizando diferentes concentrações de BSA, quantificando-se as amostras a 630nm.

ANEXO II – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE MASSAS MOLECULARES

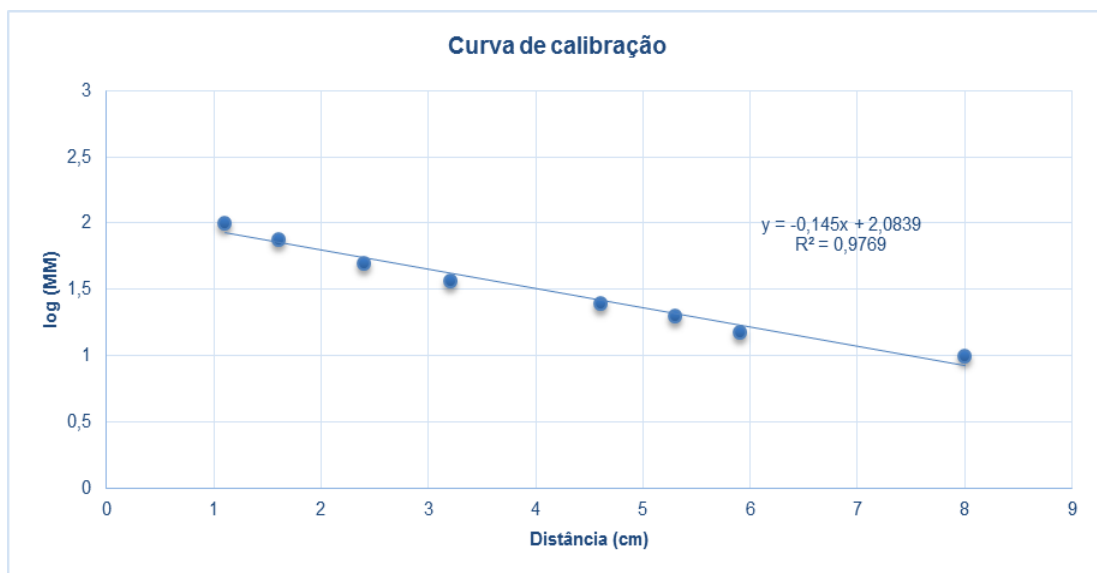


FIGURA 37 Curva de calibração de distância VS logaritmo da massa molecular

ANEXO III – COMPOSIÇÃO DE TAMPÕES UTILIZADOS

Tyrodes-Buffer 20 x

| | |
|---|-------------|
| NaCl | 160 g |
| KCl | 4 g |
| NaH ₂ PO ₄ (x 2 H ₂ O) | 1 g (0,65g) |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 2 g |
| 1 L água destilada | |

Tyrodes-Buffer 1 x Lavagem

| | | | |
|------------------------|--------|---|---|
| Tyrodes 20 x | 50 ml | } | - pH-Value 7,45 (titular com 10 N NaOH) |
| CaCl ₂ (1M) | 1,4 ml | | |
| Glucose | 1 g | | |
| HEPES | 2,4 g | | |
| 1 L água destilada | | | |

Tyrodes-Buffer 1 x Dil.

| | | | |
|------------------------|--------|---|---|
| Tyrodes 20 x | 25 ml | } | - pH-Value 7,45 (titular com 10 N NaOH) |
| CaCl ₂ (1M) | 0,7 ml | | |
| Glucose | 0,5 g | | |
| HEPES | 1,2 g | | |
| D ₂ O | 250 ml | | |
| 500 ml água destilada | | | |

Solução Stop Glicina

Glycin 3,754 g
250 ml água destilada

pH-Value = 10,7, titular com 10 N NaOH