



ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**ESTUDO PARA O DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE *OLE E1* EM AMOSTRAS DE AR
ATMOSFÉRICO COLHIDAS NA CIDADE DE ÉVORA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RAQUEL SOFIA LOPES FERRO
4860

ORIENTADOR (ES):

PROF.^a DR.^a CÉLIA ANTUNES
PROF. DR. RUI BRANDÃO

ÉVORA, 2011



ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**ESTUDO PARA O DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE OLE E1 EM AMOSTRAS DE AR
ATMOSFÉRICO COLHIDAS NA CIDADE DE ÉVORA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RAQUEL SOFIA LOPES FERRO
4860

ORIENTADOR (ES):

PROF.^a DR.^a CÉLIA ANTUNES
PROF. DR. RUI BRANDÃO

ÉVORA, 2011

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Este trabalho teve o contributo de várias pessoas que sem as quais era impossível a sua realização. Assim, quero aqui expressar o meu agradecimento à sua preciosa ajuda que, de uma forma ou de outra, tornou o evoluir deste trabalho mais fácil.

Um obrigado muito especial à Professora Doutora Célia Antunes pela orientação do trabalho, pela sua disponibilidade na resolução de todos os problemas, pelo constante acompanhamento e apoio, por todos os conselhos, pela sua amizade pela oportunidade que me proporcionou ao propor-me para colaborar com ela na realização deste trabalho e sobretudo por acreditar em mim.

Um muito obrigado ao Professor Doutor Rui Brandão também pela orientação deste trabalho, por toda a sua disponibilidade, acompanhamento e apoio imediatos, e esclarecimento de dúvidas e, claro, pela sua amizade e simpatia.

À Professora Ana Costa pela sua constante disponibilidade, por toda a ajuda prestada e boa disposição.

À Dr.^a Elsa Caeiro por toda a ajuda e simpatia.

À Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica (SPAIC) por me facultar as contagens polínicas.

À Rita por partilhar comigo as tarefas laboratoriais.

À Ana e à Inês por todos os bons momentos que vivemos, pelos famosos chazinhos, por confiarem e acreditarem em mim, por me ajudarem nos momentos difíceis, por “ralharem” quando necessário, por serem aquelas amigas.

À Ana Silveira por se ter transformado numa amiga tão especial.

À Cláudia e ao André por serem os colegas fantásticos que são e por todos os serviços prestados no laboratório.

À Dona Jesuína por todos os “ralhetes” mas sobretudo pela ajuda prestada, pela sua amizade e por todos bons momentos que me proporcionou.

À engenheira Graça e à Margarida do Laboratório de Nutrição Animal pela sua constante disponibilidade e ajuda durante as liofilizações.

Ao Professor Doutor Jeroen Buters e a toda a sua equipa pela forma como me acolheram durante a pequena missão científica que realizei no ZAUM – *Center for Allergy and Environment* em Munique.

Não posso deixar de agradecer a outros amigos que, mesmo longe, estiveram a torcer por mim, principalmente à Ana Filipa, à Mónica, ao Jorge, à Xana, à D. Manuela e ao Dr. Mário.

Um muito muito obrigado aos meus pais por todos os sacrifícios que fizeram para que eu chegasse até aqui, por todo o apoio e carinho. À minha irmã, ao Walter, ao Martim e aos meus avós por serem tão especiais e estarem sempre presentes.

E por fim, um obrigado especial ao Mário por estar presente em todos os momentos e me apoiar incondicionalmente.

Resumo

Raquel Sofia Lopes Ferro (2010). **Estudo para o Desenvolvimento de Métodos para Quantificação de Ole e1 em Amostras de Ar Atmosférico Colhidas na Cidade de Évora.** Dissertação de Mestrado (C.M. Antunes e R. Brandão, orientadores) Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

Em Portugal, a polinização da oliveira é uma das principais fontes de aeroalergénios e conseqüentemente uma das principais causas de alergia respiratória. A glicoproteína *Ole e1* é o alergénio que mais contribui para o grau de alergenicidade do pólen.

O estudo do perfil alergénico da atmosfera poderá contribuir para desenvolver estratégias preventivas desta patologia. Neste trabalho pretendeu-se otimizar métodos para quantificação de *Ole e1* ambiental.

Foram simultaneamente monitorizados o conteúdo polínico da *Olea europaea* e de aeroalergénio.

O perfil da curva de alergénio acompanhou a curva polínica, estando o conteúdo de *Ole e1* directamente correlacionado com as contagens polínicas de *Oleaceae*. A carga alergénica do pólen foi maior em 2010 que em 2009, apesar da época polínica ser mais curta e a quantidade total de pólen menor.

Estes resultados sugerem que a quantificação dos aeroalergénios pode complementar a informação obtida com as contagens polínicas para prever o risco de exposição.

Abstract

Raquel Sofia Lopes Ferro (2010). **Study for the Development of Methods for Quantification of *Ole e1* in Samples of Atmospheric Air Colected in Évora.** Master Dissertation (C.M. Antunes e R. Brandão, advisers) Sciences and Technology School, University of Évora, Évora, Portugal.

In Portugal, *Olea europea* pollination is a major source of aeroallergens and consequently a major cause of pollinosis. *Ole e1*, a glycoprotein of olive pollen grain, highly contributes to the olive pollen grain allergenicity.

The study of the aeroallergen profile may contribute to develop strategies for polinosis prevention. The aim of this work was to improve methodologies for ambient *Ole e1* quantification.

The *Olea europea* pollen and aeroallergen were simultaneously monitored using a Hirts type and a Chemvol samplers.

The aeroallergen profile followed to the pollen counts. A positive correlation was found between aeroallergen and pollen counts of *Olea europea*, for both 2009 and 2010 pollen seasons. In 2010 the allergenic potency of the pollen was higher (2x) when compared to 2009.

These results suggest that the aeroallergen quantification may account, with the pollen counts, to a better prediction of exposure to allergic bursts.

Abreviaturas

Asn – Asparagina

APCs –Células apresentadoras de antígenos (antigen-presenting cells)

BSA – Albumina de soro bovino

CDRs- regiões determinantes de complementariedade (complementarity-determining regions)

EIA – Imunoensaios enzimáticos (enzyme immunoassay)

ELISA – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulinas M

IL – Interleucina

ISAAC – Estudos Internacionais de Asma e Alergias na Infância

POX – Estreptavidina-peroxidase (Streptavidin-peroxidase)

pI – Ponto Isoelectrico

PBS – Solução salina de fosfatos

PSB-T – Solução salina de fosfatos com Tween

PRPs – Receptores de padrão de reconhecimento (pattern-recognition receptors)

RIA – Radioimunoensaio (Radioimmunoassay)

rpm – Rotações por minuto

SPAIC – Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF – Factor de necrose tumoral

Índice

1. Fundamento Teórico.....	1
1.1 Doença Alérgica.....	3
1.1.1 Prevalência e Epidemiologia.....	3
1.1.2 Hipersensibilidade Tipo I.....	4
1.1.3 Alergénios	7
1.1.4 Pólenes e os Alergénios.....	7
1.2 <i>Olea europaea</i> : Características Gerais.....	8
1.2.1 Morfologia do Pólen de <i>Olea europaea</i>	11
1.2.2 Fracções Alergénicas Presentes no Grão de Pólen da Oliveira.....	14
1.2.3 Potencial Alergénico do Grão de Pólen de <i>Olea europaea</i>	15
1.3 Métodos de Amostragem Polínica	17
1.3.1 Colectores Volumétricos de Tipo Hirst	18
1.3.2 Colectores de Impacto para Bioaerossóis.....	19
1.4 Métodos para Detecção e Quantificação de Antígenos	21
2. Problemática.....	25
3. Objectivos Científicos	29
4. Materiais e Métodos	33
4.1 Recolha de Partículas Presentes no Ar Atmosférico	35
4.1.1 Recolha de Grãos de Pólen.....	35
4.1.1.1 Mudança do Tambor Rotativo do Polinómetro Hirst.....	35
4.1.1.2 Processamento das Fitas.....	36
4.1.1.3 Análise Quantitativa da Amostra	37
4.1.1.4 Análise Qualitativa da Amostra	38
4.1.2 Recolha do Aeroalergénio <i>Ole e1</i>	38
4.1.2.1 Preparação dos Filtros de poli-uretano para Utilização no CHEMVOL-Sampler	39
4.1.2.2 Substituição dos Filtros de poli-uretano no CHEMVOL-Sampler.....	39
4.1.2.3 Extracção da Fracção Proteica e Preparação dos Extractos.....	40

4.1.2.4	Quantificação do Aeroalergénio <i>Ole e1</i>	41
4.1.2.4.1	Análise de Resultados	44
5.	Resultados e Discussão	47
5.1	Captação e Quantificação do Aeroalergénio <i>Ole e1</i>	49
5.1.1	Padronização de um Método ELISA <i>Sandwich</i> Fiável para Quantificação do Aeroalergénio <i>Ole e1</i>	49
5.2	Determinação do Conteúdo Atmosférico em Grãos de Pólen de Oliveira	52
5.3	Quantificação do Aeroalergénio <i>Ole e1</i> nos filtros XL e M.....	54
5.4	Correlação entre o Conteúdo Atmosférico do Aeroalergénio <i>Ole e1</i> e de Pólen.....	57
5.5	Efeito das Variações Meteorológicas nas Contagens Polínicas e Concentração de <i>Ole e1</i> Determinada a partir de Amostras de Ar Atmosférico Exterior	61
6.	Conclusões.....	65
7.	Perspectivas Futuras	69
8.	Bibliografia	73
9.	Anexos	85

Índice Figuras

Figura 1:	Sequência de eventos em reacções de hipersensibilidade Imediata (Adaptado de Abbas e Lichtman, 2005).	5
Figura 2:	<i>Olea europaea</i>	9
Figura 3:	Área de olival para azeite, representatividade por região 2006 (Adaptado de Portugal Agrícola 1980-2006, 2007).....	10
Figura 4:	Estrutura da exina do grão de pólen atendendo a critérios ontogénicos e físico-químicos (A) e morfológicos (B) (Adaptado de Soler e Nola, 2002).	11
Figura 5:	Pólen de <i>Olea Europeae</i> (Adaptado de Gaussorgues, 2009).	12
Figura 6:	Colector de impacto do tipo Hirst (Adaptado de Galán et al., 2007).....	19
Figura 7:	Colector Coriolis (Adaptado de Thibandon e Sindt, 2008).....	20
Figura 8:	A – Polinómetro Hirst; B – Colector CHEMVOL-Sampler.	35
Figura 9:	Substituição dos Filtros XL e M do colector de impacto CHEMVOL-Sampler.	40

Figura 10: Preparação dos tubos de Falcon contendo os filtros para a extracção.	40
Figura 11: Lavagem das microplacas.	42
Figura 12: Obtenção do produto a reacção, após a adição de TMB e paragem da reacção.	44
Figura 13: Curva de Calibração para <i>Ole</i> e1 representativa de 18 ensaios realizados. Os padrões foram preparados por diluições do padrão de <i>Ole</i> e1 50ng/mL com tampão PBS- T 1% BSA. Parâmetros determinados no ajuste sigmoidal: $A_1=0,177$; $A_2= 3,575$; $X_0=4,637$ e $p=1,318$	50
Figura 14: Variação da concentração dos controlos positivos nos ensaios realizados.	51
Figura 15: Perfis polínicos de 2009 (A) e 2010 (B).	53
Figura 16: A – Variação da concentração encontrada nos filtros M e XL durante 2009 (1) e 2010 (2). B – Correlação entre a concentração determinada a partir do filtro XL e M em 2009 (1) e 2010 (2) ($p < 0,001$).	55
Figura 17: Correlação entre a razão M/XL durante a estação polínica (em cima) e em função da concentração atmosférica de pólen (em baixo).....	56
Figura 18: Perfil da curva polínica grão de pólen de Oliveira e conteúdo do aeroalergénio <i>Ole</i> e1 presente no ar atmosférico exterior nas estações polínicas de 2009 (A) e 2010 (B).	57
Figura 19: Correlação entre as contagens polínicas e as concentração de <i>Ole</i> e1 obtidas nos filtro XL (A), M (B) e a concentração total (C) de aeroalergénio presente no ar atmosférico para as épocas polínicas de 2009 e 2010. Todas regressões são significativas, apresentando coeficientes de correlação significativos ($p<0,05$).	58
Figura 20: Histogramas de frequências diárias do grão de pólen (A) e de alergénio (B) durante as épocas polínicas de 2009 (1) e 2010 (2).	60
Figura 21: Influência dos parâmetros meteorológicos precipitação (A), temperatura (B) e vento (C) nas concentrações polínicas nas estações polínicas de 2009 (1) e 2010 (2).	61
Figura 22: Influência dos parâmetros meteorológicos precipitação (A), temperatura (B) e vento (C) nas concentrações de alergénio nas estações polínicas de 2009 (1) e 2010 (2).	62

Índice de Esquemas

Esquema 1: Esquema das microplacas utilizadas nos ensaios ELISA em que A1-A10 corresponde às diferentes amostras	43
---	----

Índice de Quadros

Quadro 1: Classificação de Doenças Imunológicas (Adaptado de Abbas e Lichtman, 2005).....	4
Quadro 2: Taxonomia da Oliveira (<i>Olea europaea</i>) (Adaptado de www.jb.utad.pt).....	9
Quadro 3: Características de pólen Oliveira	13
Quadro 4: Proteínas presentes no grão de pólen de Oliveira (Adaptado Quiralte <i>et al.</i> , 2007; www.allergen.org/ ; www.uniprot.org).....	14
Quadro 5: Concentrações polínicas referentes à Oliveira (grãos de pólen/m ³ de ar/24h) que indicam o potencial alergénico do ar atmosférico (Adaptado de Gálan <i>et al.</i> , 2007) ..	16

1. Fundamento Teórico

1.1 Doença Alérgica

O sistema imunitário, ao exercer a importante função de proteger o organismo humano contra os inúmeros agentes patogénicos a que é exposto, pode cometer erros que causam lesões tecidulares e conseqüentemente algumas patologias consideradas graves problemas de saúde. Os referidos erros começam quando o sistema imunitário reconhece um antígeno estranho, microrganismos e/ou substâncias ambientais infecciosas ou não infecciosas que muitas vezes não apresentam qualquer ameaça, e exhibe uma reacção detectável ou é sensível a exposições repetidas a esses antígenos. Este tipo de perturbação denomina-se hipersensibilidade ou alergia, como é usualmente conhecida em medicina clínica, e representa um dos mais importantes problemas de saúde pública (Abbas *et al.*, 1994; Abbas e Lichtman, 2005; Paul, 2008).

1.1.1 Prevalência e Epidemiologia

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento considerável na incidência das doenças alérgicas nas sociedades dos países desenvolvidos. Estima-se que cerca de 25% da população manifesta sintomas clínicos destas patologias, sendo o seu impacto bastante significativo (Miescher e Vogel, 2001; Weerd *et al.*, 2002; Kaliner e Lockey, 2008; Sohi e Warner 2008).

Os alérgenos presentes nos alimentos afectam 1 – 3% da população susceptível sendo o aparecimento deste tipo de alergia mais usual durante a infância. As análises epidemiológicas realizadas no âmbito dos Estudos Internacionais de Asma e Alergias na Infância (ISAAC), realizadas em 1998 indicam que as crianças que manifestam reacção alérgica aos alimentos são sobretudo sensíveis a substâncias presentes nos ovos, leite, amendoim, nozes, trigo, soja, peixe e marisco (Weerd *et al.*, 2002; Sohi e Warner 2008).

O mesmo estudo associa, ainda, as manifestações alérgicas causadas pelos alérgenos alimentares com reactividade cruzada existente entre estes e aeroalérgenos distribuídos pelo ar e que são inalados. Esses, por sua vez, são responsáveis pelas reacções alérgicas como alguns tipos de asma e a rinite alérgica, a qual, quando induzida por pólen, é também designada de polinose. Estas patologias afectam, respectivamente, 5 – 10% e 10 – 20% da população, desenvolvem-se normalmente no final da infância ou início da idade adulta e representam um dos principais problemas de saúde pública da actualidade, pois prevê-se que atinjam aproximadamente 40% da população nas próximas décadas (Weerd *et al.*, 2002; Sohi e Warner 2008).

1.1.2 Hipersensibilidade Tipo I

Em 1963, Peter Gell e Robert Combs desenvolveram um sistema para classificar as reacções imunitárias, sugerindo quatro tipos: I, II, III e IV, conforme está indicado no quadro 1 (Abbas e Lichtman, 2005; Paul, 2008; Sohi e Warner, 2008).

Quadro 1: Classificação de Doenças Imunológicas (Adaptado de Abbas e Lichtman, 2005)

Tipos de hipersensibilidade	Mecanismos imunes patológicos	Mecanismos de lesão tecidual e doença
Hipersensibilidade imediata: Tipo I	Anticorpos IgE	Mastócitos e seus mediadores (aminas vasoactivas, mediadores lipídicos, citocinas)
Mediada por células: Tipo II	Anticorpos IgM e IgG contra antígenos da superfície celular ou matriz extracelular	Opsonização e fagocitose de células; Recrutamento e activação de leucócitos (neutrófilos e macrófagos) mediados por complemento e receptor Fc; Anormalidade nas funções celulares (sinalização e receptores hormonais)
Mediada por imunocomplexos: Tipo III	Imunocomplexos de antígenos circulantes e anticorpos IgM e IgG	Recrutamento e activação de leucócitos mediados por complemento receptor Fc
Hipersensibilidade retardada: Tipo IV	1. Linfócitos T CD4+ (hipersensibilidade retardada) 2. CTLs CD8+ (Citolise mediada por linfócitos T)	1. Activação de macrófagos inflamação mediada por citocinas 2. Dirigir a destruição de células-alvo, inflamação mediada por citocinas

Destes quatro tipos de hipersensibilidade o mais relevante no caso da polinose é a hipersensibilidade de tipo I. A hipersensibilidade tipo I ou hipersensibilidade imediata é caracterizada como o tipo de hipersensibilidade mais prevalente pois engloba as doenças alérgico-respiratórias associadas a esporos fúngicos, ácaros, pêlos e epitéliosm de animais, produtos químicos e de pólenes na atmosfera, como a

asma e rinite alérgica (Behrendt e Becker, 2001; González *et al.*, 2006; Sofiev *et al.*, 2006).

Este tipo de reacção advém da ligação de anticorpos IgE a receptores presentes nas membranas dos mastócitos e posterior libertação de mediadores responsáveis pelas reacções alérgicas, iniciando-se rapidamente depois do estímulo do antígeno (Abbas *et al.*, 1994; Abbas e Lichtman, 2005).

O mecanismo subjacente às reacções de hipersensibilidade tipo I caracteriza-se pela sequência de cinco passos essenciais de acordo com a figura 1: (1) exposição aos antígenos, (2) activação das células T_H2 específicas para o antígeno em questão, (3) produção de anticorpos IgE, (4) ligação de IgE aos receptores Fc dos mastócitos e (5) estimulação de mastócitos mediante a exposição repetida ao antígeno que resulta na libertação de mediadores e na consequente reacção patológica (Abbas *et al.*, 1994; Abbas e Lichtman, 2005).

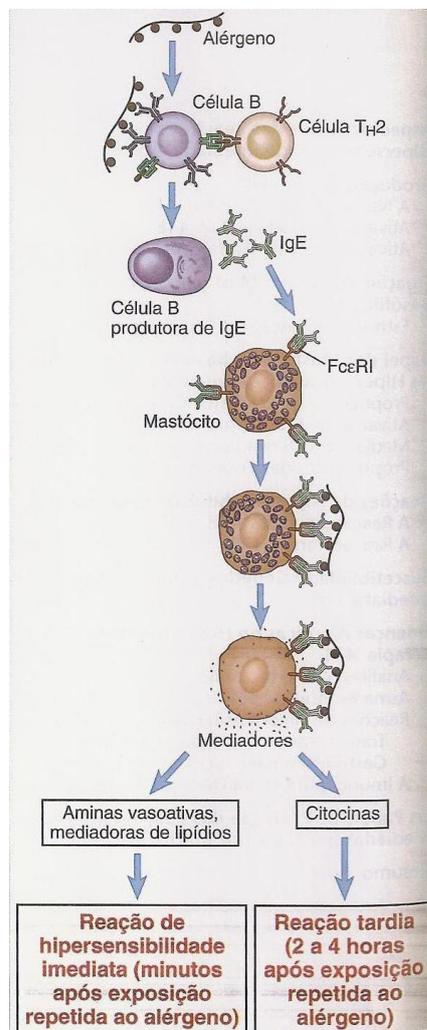


Figura 1: Sequência de eventos em reacções de hipersensibilidade Imediata (Adaptado de Abbas e Lichtman, 2005).

A reacção alérgica inicia-se quando um antigénio entra em contacto com as células dendríticas presentes nos epitélios das mucosas ou da pele e penetram no corpo humano sendo depois transportados no sangue ou na linfa até serem reconhecidos pelos linfócitos ou células B produtoras de anticorpos. Estas circulam pelos folículos dos órgãos linfoides secundários (baço, linfonodos e tecido linfóide da mucosa) e possuem receptores de membrana Ig aos quais se ligam os antigénios que, sendo de origem proteica, são processados em péptidos e apresentados na membrana dos linfócitos T auxiliares para o reconhecimento de células B. Posteriormente, as células T diferenciam-se no subconjunto T_H2, que produzindo citocinas IL-4 (Interleucina-4), estimulam a troca do isótipo das cadeias pesadas do receptor Ig (Imunoglobulina) pelo isótipo ϵ levando à síntese de IgE. A produção de IgE está relacionada com a capacidade de respostas das células T_H2, de cada indivíduo, à presença do antigénio pois a produção das IL-4 pode ser influenciada por factores genéticos, pela natureza e exposição ao antigénio (Frew, 1996; Brand *et al.*, 1999; Wedemeyer *et al.*, 2000; Behrendt e Becker, 2001; Abbas e Lichtman, 2005; Finkelman e Vercelli, 2007; Hamilton, 2010).

Após serem produzidos, os anticorpos IgE específicos libertam-se da superfície das células B, entram na corrente sanguínea e ligam-se aos domínios α dos receptores Fc ϵ RI presentes nas membranas dos mastócitos, existentes em todos os tecidos conjuntivos e sob os epitélios, de modo a que estes fiquem “sensíveis” e preparados para reagir à presença do antigénio. Os receptores Fc apresentam elevada afinidade para as cadeias pesadas ϵ das imunoglobulinas E. A esta fase do processo de hipersensibilização imediata dá-se o nome de sensibilização (Abbas e Lichtman, 2005; Kambayashi *et al.*, 2007; Kuehn e Gilfillan, 2007; Sohi e Warner 2008; Fukuda *et al.*, 2009).

A exposição repetida a antigénios permitirá que estes adiram às IgE fixados aos mastócitos e formem uma ligação cruzada com os receptores Fc, activando mensageiros secundários intracelulares que induzem a libertação de mediadores vasoactivos promotores da reacção alérgica, tais como histamina, mediadores lipídicos (prostanglandinas e leucotrienos) e citocinas como TNF (factor de necrose tumoral), IL-4 e IL-5 (Wedemeyer *et al.*, 2000; Arshad *et al.*, 2001; Abbas e Lichtman, 2005; Nakano *et al.*, 2005; Tatemoto *et al.*, 2006; Kambayashi *et al.*, 2007; Kuehn e Gilfillan, 2007; O’Gorman e Donnenberg, 2008).

1.1.3 Alergénios

Os alergénios são maioritariamente de origem animal ou vegetal, e podem dividir-se de acordo com as vias de exposição e incluem aeroalergénios (pólenes, ácaros de poeira doméstica, esporos de fungos, pêlos de animais, matéria excretada por insectos, e produtos químicos associados a bioaerossóis), alergénios alimentares, picada de insectos, fármacos e látex e os alergénios de contacto. De entre estes grupos destacam-se os aeroalergénios, visto que estão associados ao aumento exacerbado das doenças alérgico-respiratórias nos países mais desenvolvidos (Behrendt e Becker, 2001; Weerd *et al.*, 2002; Kowalski, 2006; Sofiev *et al.*, 2006; Meltzer, 2007; Paul, 2008; Ribeiro *et al.*, 2009; Hamilton, 2010). Na Europa, os aeroalergénios mais abundantes provêm dos grãos de pólen e são os principais responsáveis pelo aparecimento das doenças alérgico-respiratórias ou polinose (Behrendt e Becker, 2001; Weerd *et al.*, 2002; Sofiev *et al.*, 2006; Kaliner e Lockey, 2008; Ribeiro *et al.*, 2009).

Os principais alergénios pertencem a um grupo diverso de proteínas com estrutura tridimensional, às quais inicialmente não se associou nenhuma propriedade biológica dominante, ou produtos químicos a elas ligados e que por inalação, ingestão ou contacto promovem a produção de IgE específicas em indivíduos susceptíveis e causando reacções alérgicas (Steinberger *et al.*, 1996; Shivana e Sawhney, 1997; Hantusch *et al.*, 2005; Kowalski, 2006; Rodriguez *et al.*, 2007; Kaliner e Lockey, 2008; Paul, 2008; Hamilton, 2010).

Actualmente, crê-se que os alergénios podem ser proteínas que activam a resposta imunitária inata através da sua actividade enzimática intrínseca, através da activação de receptores com padrões de reconhecimento (PRRs – *pattern-recognition receptors*) nas células da mucosa epitelial ou directamente nas células apresentadoras de antígenos (APCs – *antigen-presenting cells*) (Behrendt e Becker, 2001; Rodríguez *et al.*, 2007; Paul, 2008).

1.1.4 Pólenes e os Alergénios

Os alergénios presentes nos grãos de pólen são, geralmente, glicoproteínas específicas com pesos moleculares baixos compreendidos entre 8-70 kDa, cuja capacidade de interacção com o sistema imunitário e posterior desenvolvimento de reacções de hipersensibilidade tipo I depende da sua localização no grão de pólen, da hidrosolubilidade, rapidez de solubilização e, em consequência do nível de hidratação deste, da sua estabilidade molecular e do reconhecimento dos constituintes proteicos

pelo sistema imunitário humano (Barral *et al.*, 2002; Weerd *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2005; Kaliner e Lockey, 2008).

Crê-se actualmente que os aeroalergénios polínicos possam estar presentes na atmosfera fora do grão de pólen, quer isoladamente quer adsorvidos a partículas submicrónicas (< 10µm), sendo este último caso claramente maioritário. O transporte destas proteínas ocorre essencialmente através do vento durante o período de polinização, não havendo no entanto, consenso a respeito desta questão entre a comunidade científica (Kowalski, 2006; Linares *et al.*, 2007).

Para além disso, desconhece-se a localização celular de muitos dos alergénios polínicos, bem como os processos responsáveis pela acumulação dos mesmos nos grãos de pólen. Existem, actualmente, evidências (estudos realizados em Bétula) de que a carga alergénica dos grãos de pólen pode ser afectada por diversos factores, para além do perfil genético da planta, incluindo o período em que estes permanecem na antera antes da polinização e factores climáticos locais e/ou sazonais (Buters *et al.*, 2010).

Entre os milhares de plantas existentes, são poucas as famílias que estão envolvidas na produção de pólenes portadores dos principais alergénios: *Poaceae* (muitas espécies), *Oleaceae* (*Olea*, *Fraxinus* e *Ligustrum*), *Urticaceae* (*Parientaria* e *Urtiga*), *Compositae* (*Artemisia* e *Ambrosia*), *Chenopodiaceae-Amaranthaceae* (*Salsola*, *Chenopodium* e *Amaranthus*), *Plantaginaceae* (*Plantago*), *Polygonaceae* (*Rumex*), *Betulaceae* (*Betula*, *Alnus* e *Corylus*), *Platanaceae* (*Platanus*), *Cupressaceae* (*Criptomeria*), *Fagaceae* (*Quercus*), *Pinaceae* (*Pinus*) e *Euphorbiaceae* (*Mercurialis*) (Santiago e Vallés, 2002; Weerd *et al.*, 2002; Kowalski, 2006).

Nos países europeus, os aeroalergénios polínicos mais abundantes na atmosfera e que atingem as vias aéreas superiores causando alergias, pertencem às famílias *Poaceae*, *Betulaceae* e *Oleaceae*. Porém, a polinização da oliveira (pertencente à família *Oleaceae*) é uma das maiores causas da alergia respiratória nos países mediterrânicos, onde se inclui Portugal (Tereja *et al.*, 1999; González *et al.*, 2002; Barral *et al.*, 2005).

1.2 *Olea europaea*: Características Gerais

A família das oleaceas (*Oleaceae*) é a principal da ordem das Lamiales e engloba 600 espécies agrupadas em 29 géneros que se encontram amplamente distribuídas em toda a bacia mediterrânica. A *Olea europaea* (quadro 2, figura 2), usualmente conhecida por oliveira, é a espécie das *Oleaceae* mais abundante na Península Ibérica e apresenta duas variedades: *Olea europaea* var. *europaea* (oliveira

de cultivo) e a *Olea europaea* var. *sylvestris* (Bernard e Bervillé, 2000; Hernández *et al.*, 2002; Cavallotti *et al.*, 2003; Terral *et al.*, 2004).

Quadro 2: Taxonomia da Oliveira (*Olea europaea*) (Adaptado de www.jb.utad.pt)

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Lamiales
Família	Oleaceae
Género	Olea
Espécie	<i>Olea europaea</i>



Figura 2: *Olea europaea*.

É uma árvore pertencente às angiospérmicas do grupo das dicotiledóneas, que pode atingir 15m de altura e caracteriza-se por possuir (Hernández *et al.*, 2002):

- ✓ **Tronco:** grosso, resistente e retorcido;
- ✓ **Folhas:** simples, lanceoladas de cor verde escura numa das fases enquanto noutra apresentam uma coloração acinzentada;
- ✓ **Flores:** pequenas, brancas, pouco vistosas, hermafroditas (raramente unissexuais) e agrupam-se em pequenos ramalhetes nas extremidades dos ramos terminais. Possuem um cálice que se apresenta como uma peça única persistente com 4 lóbulos e uma corola hipocraterimorfa (com um tubo longo e fino e os lóbulos quase horizontais) composta por quatro pétalas. O órgão reprodutor masculino desta flor é constituído por dois estames, que se encontram ligados ao tubo da corola, cujos filamentos são geralmente curtos e as anteras possuem duas cavidades. Por outro

lado, o pistilo é formado por um carpelo, um ovário supero bilocular e um estilete simples, terminal com um estigma bi-lobulado;

- ✓ **Fruto:** drupa oleaginosa de forma elíptica, verde escura ou negra.

A oliveira cresce facilmente em matos, terrenos incultos e rupícolas, suporta o calor e a seca contudo é sensível ao frio, não tolera temperaturas inferiores a -9°C ou uma temperatura média de apenas 3°C nos meses mais frios. Em Portugal (figura 3), é sobretudo cultivada no sul do país, onde as temperaturas são normalmente mais elevadas, em pequenas quintas, pomares e/ou como árvore ornamental. Mais recentemente a sua cultura tem vindo a expandir-se graças a técnicas de regadio que aumentam a respectiva produção em frutos (www.jb.utad.pt, Hernández *et al.*, 2002).

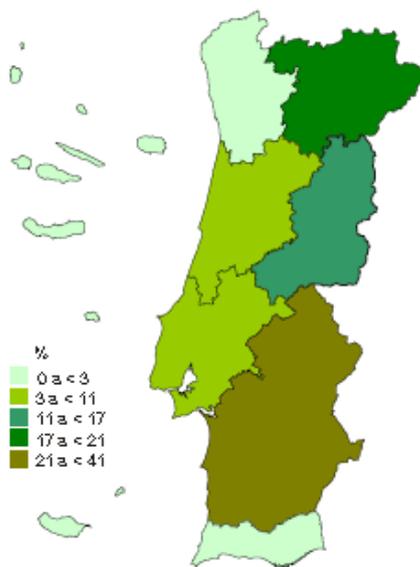


Figura 3: Área de olival para azeite, representatividade por região 2006 (Adaptado de Portugal Agrícola 1980-2006, 2007).

A sua floração e polinização correspondem a um período, geralmente curto mas intenso, compreendido entre Maio e Junho, durante o qual existem grandes quantidades de pólen na atmosfera. A floração apresenta um ritmo bianual, isto é, após anos de elevada produção polínica sucedem-se anos em que esta é reduzida, e a sua polinização ocorre sob duas formas: anemófila e entomófila (Cariñanos *et al.*, 2004; Kirmaz *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2010; www.rpaerobiologia.com).

Na região mediterrânica, esta árvore é muito importante do ponto de vista económico, uma vez que é a árvore mais cultivada nesta região, estando os seus frutos e azeite entre os mais importantes e antigos produtos comercializados. Do ponto de vista alergológico também o é, podendo ser considerada um risco para a saúde pública uma vez que o pólen de Oliveira é uma das causas mais frequentes de

polinoses nesta região (Asturias *et al.*, 1997; Cavallotti *et al.*, 2003; Díaz de la Guardia *et al.*, 2003; Galán *et al.*, 2004).

1.2.1 Morfologia do Pólen de *Olea europaea*

Os grãos de pólen são constituídos por uma ou várias células vivas protegidas por membranas inertes. A porção viva do pólen originará os gâmetas e o tubo polínico de algumas gimnospérmicas, enquanto a função das membranas inertes é proteger a parte viva durante o processo de polinização. A última denomina-se esporoderme ou camada externa e é constituída por duas camadas: intina e exina diferenciadas de acordo com sua ontogenia, morfologia e composição química (Hesse *et al.*, 2009; Suárez-Cervera e Seoane-Cambra, 2005).

A intina é a parede mais interna do grão de pólen e caracteriza-se por ser quimicamente pouco resistente e tem como função regular a pressão osmótica do grão de pólen (Hesse *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2007; Suárez-Cervera e Seoane-Cambra, 2005).

A exina, sendo a parede mais externa do grão de pólen, é muito resistente à oxidação, ataque ácido-base, e a temperaturas superiores a 300°C. A exina diferencia-se de acordo com critérios ontogénicos e físico-químicos em endoxina e ectoxina. A primeira tem estrutura lisa e homogênea, excepto nas aberturas onde pode existir engrossamento e a segunda é a camada mais externa formada por três capas: tectum, intratectum e capa basal. Por outro lado e segundo critérios morfológicos, a parede mais externa do grão de pólen subdivide-se ainda em sexina e nexina (figura 4).

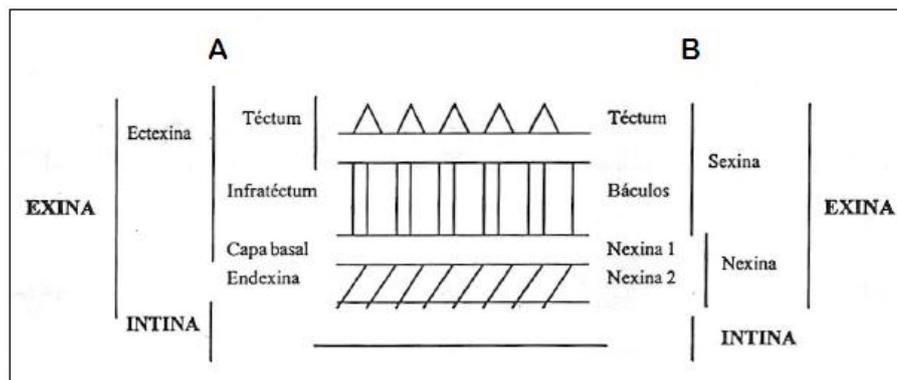


Figura 4: Estrutura da exina do grão de pólen atendendo a critérios ontogénicos e físico-químicos (A) e morfológicos (B) (Adaptado de Soler e Nola, 2002).

Os pólenes classificam-se de acordo com a sua forma e seu tamanho e ainda de acordo com as características relacionadas com o aspecto da exina.

Durante a formação dos grãos de pólen é possível distinguir uma zona proximal, mais próxima do centro, e uma mais afastada, zona distal, definidas em relação ao eixo equatorial. No centro de cada uma destas zonas encontram-se as áreas denominadas pólos. A linha imaginária que une os pólos chama-se eixo polar enquanto ao eixo perpendicular a este dá-se, então, o nome de eixo equatorial. A relação entre estes dois eixos é essencial para determinar a forma dos pólenes que podem ser isopolares se os pólos distal e proximal forem semelhantes ou heteropolares se forem diferentes (Hesse *et al.*, 2009).

As aberturas são regiões da parede do pólen com redução acentuada ou ausência de camadas da parede polínica nomeadamente da exina e encontram-se envolvidas na germinação do grão de pólen e controlo da pressão osmótica das células. Estas perfurações nas membranas são classificadas em função da sua forma, chamando-se colpos se são largos, poros se a relação comprimento/largura é pequena ou colporado caso sejam compostas por colpos e poros. As aberturas podem variar em função do número e da posição. Assim, de acordo com o número, os grãos de pólen podem ser classificados com mono- se apresentarem apenas uma, di- se possuírem duas, tri- três e assim sucessivamente até poliaperturados se possuírem várias aberturas. Por outro lado, a sua posição também determina a classificação polínica. Se as aberturas se dispuserem por toda a superfície do pólen atribui-se o prefixo panto-, na zona equatorial zono-, cata- se estiver na zona proximal, ana- se está na distal ou normalmente anacata- se está presente as duas posições. A combinação do número, posição e tipo de aberturas origina uma grande variedade de tipos polínicos (Hesse *et al.*, 2009).

De acordo com os estes parâmetros, as características morfológicas do grão de pólen de oliveira (figura 5) que é um dos portadores dos aeroalergénios mais importantes em países europeus como Portugal, Espanha, Itália, Israel, Grécia e Turquia e em algumas zonas da América do Norte (Califórnia, Arizona) encontram-se apresentadas no quadro 3 (González *et al.*, 2002; Kirmaz *et al.*, 2005; Barber *et al.*, 2007; Carbala *et al.*, 2007; Hamman-Khalifa *et al.*, 2008).



Figura 5: Pólen de *Olea Europaea* (Adaptado de Gaussorgues, 2009).

Quadro 3: Características de pólen Oliveira

	Características	Referência
Dispersão	Mónada	Caeiro, 2004;
Polaridade	Isopolar	Caeiro, 2004;
Simetria	Radial	Caeiro, 2004;
Forma	Esferoidal prolada	Caeiro, 2004; www.rpaerobiologia.com, 2010 Hernández <i>et al.</i> , 2002;
Tamanho	18-22 µm (pequeno)	Caeiro, 2004; www.rpaerobiologia.com, 2010;
Aberturas	Trizonocolporado com colpos muito largos, poros não definidos, apreciáveis numa zona clara no centro dos colps. Membrana apertural granulada.	Hernández <i>et al.</i> , 2002; Caeiro, 2004;
Exina	Espessa, reticulada. Sexina com columelas diferenciáveis da nexina	Caeiro, 2004;
Intina	Fina formando oncus	Caeiro, 2004;
Ornamentação	Reticulada	Caeiro, 2004;
Citoplasma	Com grânulos	Caeiro, 2004;

A alergia a este pólen depende de factores ambientais tais como as condições geográficas e sazonais (Asturias *et al.*, 1997).

Torna-se, ainda, importante referir que existe uma reactividade cruzada entre algumas proteínas alérgicas do pólen de plantas pertencentes à família *Oleaceae* e *Olea europaea* e também com pólenes não relacionados filogeneticamente, como os das gramíneas. A maioria dos pacientes sensíveis ao pólen de *Olea europaea*

apresenta outras sensibilizações associadas, sendo assim polisensibilizados. É, pois, raro encontrar pacientes apenas sensíveis a este pólen, isto é, pacientes monossensíveis. A monossensibilização ao pólen da oliveira é mais comum nas áreas onde esta é cultivada de uma forma intensiva como é o caso da Andaluzia, onde as concentrações podem atingir valores de 3000 – 5000 grãos de pólen/m³ durante a estação polínica (Caeiro, 2004; Florido *et al.*, 2009).

1.2.2 Fracções Alergénicas Presentes no Grão de Pólen da Oliveira

Estudos bioquímicos e moleculares já realizados indicam a existência de uma mistura complexa de proteínas alergénicas presentes no grão de pólen de oliveira. Até ao momento, foram caracterizados e isolados treze alergénios existentes neste pólen, *Ole e1* a *Ole e12*, quadro 4 (Hernández *et al.*, 2002; Barral *et al.*, 2006; Alché *et al.*, 2007; Linares *et al.*, 2007; Quiralte *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2007; Gaussorgues, 2009; www.allergen.org; www.uniprot.org/).

Quadro 4: Proteínas presentes no grão de pólen de Oliveira (Adaptado Quiralte *et al.*, 2007; www.allergen.org/; www.uniprot.org/)

	Massa Molecular (kDa)	Família	Ligação ao IgE (%)
<i>Ole e1</i>	18,5-20	Glicoproteína	55-90
<i>Ole e2</i>	14-16	Profilina	74,6
<i>Ole e3</i>	9,2	Polcalcina	20-25
<i>Ole e4</i>	32	Desconhecida	80
<i>Ole e5</i>	16	Cu/Zn Superperóxido dismutase	35
<i>Ole e6</i>	5,8	Desconhecida	15-55
<i>Ole e7</i>	10	Proteína de transferência lipídica	45
<i>Ole e8</i>	18,8	Proteínas que complexam Ca ²⁺	15
<i>Ole e9</i>	46	1,3 β - Glucanase	65
<i>Ole e10</i>	10	CBM43 (Carbohydrate-binding module)	55
<i>Ole e11</i>	37, 4	Pectinesterase	55,9- 75,6
<i>Ole e12</i>	34,1	Isoflavona retutase	

Ole e1 foi o primeiro alergénio a ser purificado a partir da *Olea europaea* e representa mais de 10% do teor proteico do seu grão de pólen. É descrita como a principal proteína alergénica uma vez que mais de 70% dos pacientes alérgicos ao pólen de oliveira apresentam sensibilidade a este alergénio (González *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2005; Kirmaz *et al.*, 2005; Huercas *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2007).

Sabe-se que é constituída por 145 aminoácidos que se encontra no pólen mas que não existe nos frutos, folhas, e caules, facto que torna estes tecidos não indutores da polinose causada pelo pólen de Oliveira. *Ole e1* é principalmente armazenada nas cisternas do reticulo endoplasmático rugoso porém estando o pólen em estágio de maturação, as cisternas são transformadas em pequenas vesículas que se dispersam pelo citoplasma. Também durante este estágio, *Ole e1* pode ser encontrada na exina (membrana externa) do grão de pólen onde desempenha uma função importante relacionada com a hidratação e germinação do grão de pólen (Linares *et al.*, 2007; Napoli *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2007; Kaliner e Lockey, 2008).

A *Ole e1* é uma proteína polimórfica ácida (pI 5,2) que apresenta duas variantes: uma não glicosilada (18,5 kDa) e outra glicosilada (22 kDa). A glicosilação ocorre num resíduo de asparagina, Asn¹¹¹ (Cabada *et al.*, 2000; Napoli *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009).

O mapa antigénico da proteína *Ole e1* identifica três regiões que podem ser consideradas como epitopos de reconhecimento para células T nas posições 111-113, 91-102 e 109-130 da cadeia polipeptídica, tendo-se confirmado que a união deste alergénio com a IgE específica se realiza pela estrutura conformacional e não sequencial (González *et al.* 2006).

É, igualmente importante referir que a sequência aminoacídica de *Ole e1* possui uma homologia relevante com alergénios e outras espécies de *Oleaceas* como *Ligustrum* (*Lig v1*), *Fraxinus* (*Fra e1*) e *Syringa* (*Syr v1*) e com plantas taxonomicamente não relacionadas como *Plantago* (*Pla l1*), *Lolium* (*Lol p11*) e *Chenopodium* (*Che a1*) sugerindo que possam existir reacções cruzadas entre as proteínas das várias espécies (Caeiro, 2004).

1.2.3 Potencial Alergénico do Grão de Pólen de *Olea europaea*

O pólen da oliveira tem sido referido como um dos principais responsáveis pelas doenças alérgico-respiratórias na bacia mediterrânea, motivo pelo qual se tem tentado determinar o nível mínimo de exposição que causa sintomas alérgicos, como forma de contribuir para a criação de sistemas de alerta de risco. Contudo, este assunto tem levantado muita controvérsia uma vez que este valor de concentração

varia de acordo com uma região em concreto tendo em conta os diversos factores que influenciam a quantidade de pólenes existentes no ar, por um lado, como abundância de espécies e as condições climatéricas particulares dessa área nessa região, e a existência de factores coadjuvantes, por outro, nomeadamente a presença de outras espécies que podem estabelecer reactividade cruzada com o alergénio em questão, a presença de poluentes atmosféricos e ainda a sensibilidade individual para o que contribuem os factores genéticos (Carbada *et al.*, 2007; Gálan *et al.*, 2007).

De facto, os estudos existentes apontam para valores mínimos de pólen de Oliveira suficiente para desencadear sintomas alérgicos muito díspares. Waisel *et al.* (2004) indicam 4 grãos de pólen/m³ de ar/24h como a concentração necessária às reacções alérgicas, enquanto Florido *et al.* (1999) referem 400 grãos de pólen/m³ de ar/24h como a concentração de grãos de pólen necessária para que haja sintomas moderados de alergias ao pólen de Oliveira. Estes autores utilizaram critérios diferentes de classificação e os colectores utilizados nos estudos encontravam-se a alturas bastantes distintas, o que pode ter contribuído para a discrepância entre os valores reportados. Por outro lado, a possibilidade de existir uma grande variabilidade do conteúdo de alergénio nos grãos de pólen, já demonstrado em Buters *et al.* (2010) para bétula, torna difícil o estabelecimento de níveis polínicos de risco reconhecidamente eficazes.

No entanto, existem algumas redes de aerobiologia, como é o caso da Rede Espanhola de Aerobiologia (REA), que procuraram efectuar uma classificação de níveis de risco, em particular para a Oliveira. Gálan *et al.* (2007) no Manual de Qualidade e Gestão da REA definiram quatro categorias de potencial alergénico (nulo, baixo, moderado e alto) onde estabelece intervalos de concentração de pólen de Oliveira (quadro 5).

Quadro 5: Concentrações polínicas referentes à Oliveira (grãos de pólen/m³ de ar/24h) que indicam o potencial alergénico do ar atmosférico (Adaptado de Gálan *et al.*, 2007)

Potencial alergénico	Concentração Polínica (grãos de pólen/m ³ /24h)
Nulo	1
Baixo	1-50
Moderado	50-200
Alto	> 200

Em Portugal não existem quaisquer estudos semelhantes, onde se estabeleçam os níveis de concentração de grãos de pólen de Oliveira susceptíveis de causar sintomas de alergia. Para de alergénios polínicos propriamente ditos, enquanto agentes directos das reacções alérgicas, não existem, de todo, quaisquer indicadores, desconhecendo-se, inclusivamente, os níveis de alergénios médios por grãos de pólen.

1.3 Métodos de Amostragem Polínica

A amostragem do ar utilizada desde o século XIX para averiguar a presença de bioaerossóis, especialmente de pólenes, no ar atmosférico exterior tem-se revelado extremamente útil, uma vez que com o aumento exacerbado das doenças alérgicas respiratórias induzidas após exposição ao pólen permite avaliar o potencial alergénico do ar e prevenir o desenvolvimento de sintomas por parte dos pacientes (Levetin, 2004; Moreno-Grau *et al.*, 2007).

A amostragem de partículas aéreas pode ocorrer passivamente, pela gravidade, ou activamente através de instrumentos específicos que produzem o impacto ou filtração dos bioaerossóis (Levetin, 2004; Moreno-Grau *et al.*, 2007).

A primeira abordagem caracteriza-se por incluir métodos de amostragem mais simples e baratos e consiste na exposição ao ar de uma lâmina de vidro ou caixa de Petri aberta, revestidas com agar, no qual as partículas ficam retidas, durante um espaço de tempo previamente definido. A amostragem por gravidade trata-se de um método meramente qualitativo em que se analisam as amostras visando apenas a forma e tamanho das partículas, permitindo somente a observação de partículas de maiores dimensões como pólenes e esporos. Partículas de pequenas dimensões podem não ser detectáveis (Levetin, 2004).

A amostragem de bioaerossóis por impactação consiste na separação de partículas de acordo com o seu estado de inércia levando-as a depositarem-se numa superfície sólida ou de agar através da intercepção do fluxo do ar, pelo meio de amostragem. Existe uma grande variedade de colectores de impacto que permitem recolher amostras polínicas de ar exterior, como os colectores assentes na metodologia de Hirst. Estas amostras são geralmente analisadas ao microscópio. Existe, ainda, outro método de recolha de partículas presentes no fluxo de ar através do impacto que ocorre, igualmente, de acordo com o seu estado de inércia, as partículas ficam depositadas num meio líquido que pode evaporar-se se a amostragem ocorrer durante um longo período de tempo reduzindo-se a eficiência da amostragem (Levetin, 2004).

Por fim, a filtração consiste na amostragem através da separação de partículas, utilizando-se um substrato poroso cujo material e as suas dimensões dependem do bioaerossol a capturar, assim como do tipo de análise desejada. A eficiência da colheita através da filtração é geralmente elevada, mas depende da dimensão dos poros e da taxa de fluxo de ar que passa por eles (Levetin, 2004).

A escolha do tipo de amostragem deve ser cuidadosa e realizar-se com base no tipo de dados que se pretende obter.

Para amostragem polínica recorre-se normalmente a colectores de impacto em que os colectores volumétricos assentes na metodologia Hirst são hoje a norma embora o colector Rotorod seja ainda muito usado nos Estados Unidos da América (EUA). Contudo, diversos protótipos têm vindo a ser desenvolvidos nos últimos anos para quantificação em simultâneo das partículas polínicas e dos respectivos aeroalergénios que estes contêm (ex: Coriolis, Bertin Technologies) ou então somente para aeroalergénios como o CHEMVOL-Sampler (Thibaudon e Sindt, 2008).

1.3.1 Colectores Volumétricos de Tipo Hirst

O primeiro colector de impacto foi desenhado por *Hirst* em 1952 (Levetin, 2004; Gálan *et al.*, 2007).

A amostragem realizada através este tipo de colector baseia-se na sucção de um fluxo de ar de 10 L/min através de uma unidade de impacto que diz respeito a um orifício (14mm x 2mm) e de um suporte circular (tambor) munido de uma cinta Melinex impregnada com silicone onde ficam retidas as partículas aspiradas. Este suporte circular encontra-se ligado a um relógio com um mecanismo giratório que possibilita a sua passagem pelo orifício a 2 mm/h permitindo, assim, discriminar o tempo de amostragem. Da constituição do Burkard faz parte, também, um cata-vento que permite que o orifício se encontre sempre orientado contra o vento (Levetin, 2004; Gálan *et al.*, 2007) (figura 6).

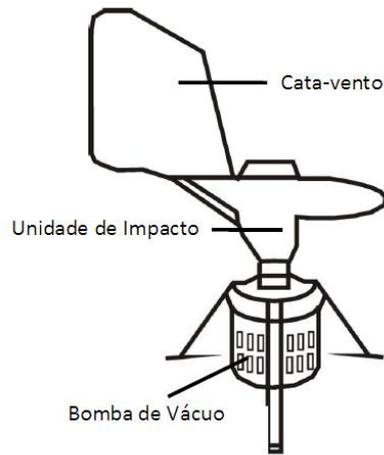


Figura 6: Coletor de impacto do tipo Hirst (Adaptado de Galán et al., 2007).

A unidade de impacto permite a recolha de pólen com dimensões superiores a 200 μm .

O tambor é substituído semanalmente e a fita é removida e cortada em sete pedaços de 48 mm que representam os 7 dias de amostragem. Os segmentos da fita são depois fixados às lâminas de microscopia e coradas com fucsina básica que evidenciam a exina dos grãos de pólen permitindo a sua identificação microscópica (Levetin, 2004).

São muitos os autores que referem a utilização deste tipo de colectores na amostragem de diversos pólenes. Carvalho *et al.* (2008) refere que este é um dos métodos mais utilizados na quantificação polínica enquanto Buters *et al.* (2010) utilizam-no para determinar concentrações polínicas de Bétula. Florido *et al.* (1999), Galán *et al.*, (2001), Linares *et al.* (2007) e Thibaudon e Sindt (2008) descrevem-no como o método utilizado para quantificação de grãos de pólen de oliveira, pelo que foi a metodologia escolhida para monitorizar a concentração atmosférica de grãos de pólen de oliveira durante a realização deste trabalho. É também a tecnologia padrão para muitas outras partículas polínicas.

1.3.2 Colectores de Impacto para Bioaerossóis

Sabendo-se que provavelmente são as pequenas fracções proteicas presentes no grão de pólen as responsáveis pelo aumento da polinose e que estas se encontram livres no ar ou associadas a partículas submicrónicas, torna-se importante o desenvolvimento de metodologias que permitam a sua amostragem e consequentemente a sua quantificação (Kowalski, 2006; Linares *et al.*, 2007).

Um tipo de colector de impacto utilizado para esse fim é o CHEMVOL-Sampler que ao estar ligado a uma bomba digital com um fluxo de 800L/min que proporciona a sucção das partículas presentes no ar atmosférico exterior e o seu impacto sobre os filtros de poli-uretano de tamanhos diferentes onde as partículas ficam retidas e que se encontram no interior da campânula que constitui o colector. Normalmente são utilizados três filtros (XL, M e S) onde as partículas (P) ficam retidas de acordo com as suas dimensões, $P > 10 \mu\text{m}$ ficam retidas no filtro XL, $10 \mu\text{m} > P > 2,5 \mu\text{m}$ ficam no filtro M enquanto o filtro S captura partículas de dimensões compreendidas entre $2,5 \mu\text{m} - 0,25 \mu\text{m}$ (Buters *et al.*, 2010).

Mais recentemente, desenvolveu-se outra metodologia que para além de permite a recolha dos grãos possibilita a captura e análise dos aeroalergénios causadores de polinoses, o colector Coriolis (figura 7). Esta refere-se a um colector desenvolvido por *Bertin Technologies* e que se baseia na recolha e selecção de partículas por acção de um dispositivo ciclónico que ao girar promove a sucção do ar, com uma taxa de fluxo compreendida entre 200 a 630 L/min através, de um frasco cónico, sendo as partículas impulsionadas contra a parede do cone por acção da força centrífuga. As partículas são separadas do ar e colhidas num meio líquido (Carvalho *et al.*, 2008).

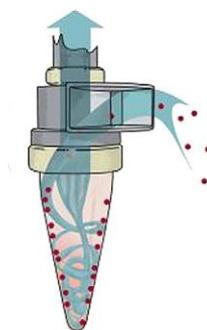


Figura 7: Colector Coriolis (Adaptado de Thibandon e Sindt, 2008).

A análise das amostras obtidas pelos dois métodos descritos para a recolha de alergénios pode ser realizada através de métodos imunoquímicos, sendo estes específicos para quantificação das fracções proteicas alergénicas provenientes dos pólenes (Levetin, 2004; Carvalho *et al.*, 2008; Thibaudon e Sindt 2008).

Para a realização do trabalho aqui descrito recorreu-se ao colector CHEMVOI-Sampler uma vez que recolhe um volume de ar muito superior ao segundo método referido.

1.4 Métodos para Detecção e Quantificação de Antígenos

Anticorpos são proteínas produzidas pelo sistema imunitário como resultado da exposição dos tecidos a uma substância estranha ao organismo e que ao ligar-se a ela promove o desenvolvimento de uma reacção imunológica adequada. Os métodos imunoquímicos são ensaios de ligação e baseiam-se na ligação selectiva entre o antígeno e o anticorpo. A associação entre moléculas envolve a formação de múltiplas ligações não covalentes entre o epitopo do antígeno e os resíduos de aminoácidos das regiões variáveis do anticorpo, regiões determinantes de complementariedade (CDRs) (Roitt *et al*, 1996).

De um modo geral, as vantagens dos métodos imunoquímicos estão relacionadas com a sua sensibilidade, especificidade, facilidade de uso e permitem a quantificação de uma enorme variedade de proteínas, destacando-se, neste caso, os alérgenos presentes nos grãos de pólen. Contudo, apresentam desvantagens que advêm do tempo dispendido durante o estabelecimento do método e dos elevados custos dos reagentes e equipamentos de análises (Levetin, 2004; Emon, 2007).

Os métodos imunológicos podem ser qualitativos, usados apenas para detectar antígenos específicos, semi-quantitativos, que podem ser utilizados para detectar e/ou avaliar a abundância relativa de um determinado antígeno, e quantitativos os quais permitem efectivamente quantificar antígenos específicos com recurso a curvas padrão (Holme e Peck, 1998; Emon, 2007).

Com excepção dos métodos baseados na imunoprecipitação, onde a formação de complexos supramoleculares de antígeno-anticorpo que se tornam insolúveis e originam um precipitado branco, a detecção deste complexo implica a utilização de proteínas marcadas que possam ser mensuráveis. Os agentes de marcação podem ser rádio-isótopos, actualmente já pouco usados (Radioimuno-ensaios – RIA), enzimas, muito usadas nas técnicas de *immunoblott* e EIA (*Enzyme Immunoassay*) ou fluoróforos (Kemeny, 1991; Holme e Peck, 1998; Levetin, 2004; Crowther, 2007).

No que se refere à análise dos aeroalérgenos a partir de extractos obtidos de grãos de pólen ou no soro dos pacientes, os métodos mais usados têm sido o *immunoblott*, para identificação e avaliação semiquantitativa da reactividade, e as técnicas de ELISA que têm actualmente estado a ser introduzidas para a quantificação de aeroalérgenos (Arrila *et al.*, 2002; Barral *et al.* 2002; Aché *et al.*, 2007).

Estes últimos caracterizam-se pela utilização de um anticorpo marcado com um enzima que por acção sobre um substrato origina um produto corado cuja concentração será proporcional à quantidade de antígeno na amostra, também

conhecidos por métodos ELISA. Estes são referidos na literatura como métodos sensíveis e reprodutíveis (Chard, 1990; Holme e Peck, 1998; Buters *et al.*, 2010), adequados para a quantificação de aeroalergénios polínicos, nomeadamente, o alergénio *Ole e1* (Arrila *et al.*, 2002; Linares *et al.*, 2007).

O método ELISA surgiu pela primeira vez em 1971 por Engvall e Perlmann quando estes conseguiram quantificar imunoglobulinas G (IgG) em soro de coelho utilizando o enzima fosfatase alcalina. Assim, esta técnica laboratorial pode ser descrita como um ensaio imunoenzimático utilizado em análises quantitativas de anticorpos e antigénios em que um dos reagentes se encontra marcado com um enzima (Law *et al.*, 2005; Lequin, 2005; Miura *et al.*, 2007).

O ELISA surge mais vantajoso que os métodos imunológicos já existentes, pois os rádio-isótopos utilizados em RIA são substituídos por uma vasta gama de enzimas (ureases, fosfatase alcalina, peroxidases e β -galactosidases) que em contacto com um substrato adequado originam um produto corado que pode ser quantificado por espectrometria de absorção molecular. Por outro lado, distingue-se de outros EIA uma vez que no ELISA ocorre a ligação por adsorção de um dos reagentes a uma fase sólida, que normalmente corresponde à superfície de uma microplaca de 96 poços, conferindo-lhe a possibilidade de analisar muitas amostras em simultâneo e de facilitar a automação dos ensaios (Holme e Peck, 1998; Wilson e Walker, 2000; Law *et al.*, 2005; Miura *et al.*, 2007; Crowther, 2009).

São três, os sistemas principais de ELISA (Crowther, 2009):

✓ **Directo:** forma mais simples de ELISA em que o antigénio se associa à fase sólida e posteriormente é adicionado um anticorpo marcado com um enzima que após processos de incubação e lavagem, em contacto com o substrato desenvolve uma reacção cromogénea;

✓ **Indirecto:** os anticorpos reagem com os antigénios imobilizados na fase sólida. A ligação destes anticorpos ao antigénio é detectada pela associação de um segundo anticorpo marcado com enzima. Este método é amplamente utilizado em ensaios de diagnóstico;

✓ **Sandwich:** este método pode ser dividido em dois sistemas: (1) directo e (2) Indirecto. O primeiro explora anticorpos ligados às paredes dos poços da microplaca para capturar antigénios. O antigénio, é por sua vez, detectado por um anticorpo secundário marcado com o enzima. À semelhança do *sandwich* directo, o *sandwich* indirecto também se baseia na capturação do antigénio por um anticorpo imobilizado na fase sólida e na ligação de um segundo anticorpo ao antigénio; A detecção do complexo, contudo, faz-se apenas após adição de um conjugado.

A existência destas diversas variantes contribui para a flexibilidade do método ELISA uma vez que mais que um sistema pode ser utilizado para quantificar o mesmo

analíto. A selecção deve depender da natureza da amostra, da disponibilidade de reagentes, da precisão e sensibilidade requeridas (Kemeny, 1991; Crowther, 2009).

O tipo de ensaio ELISA escolhido para quantificação do aeroalergénio *O/e* e1 foi o ELISA *sandwich* directo uma vez que este pode ser particularmente útil para quantificar alergénios pois caracteriza-se por ser preciso, reprodutível e específico permitindo a utilização de extractos totais ou amostras impuras (Arrila *et al.*, 2002; Paweska *et al.*, 2005; Osmekhina *et al.*, 2010; Watcharatanyatip *et al.*, 2010).

2. Problemática

As doenças alérgico-respiratórias associadas a esporos fúngicos, ácaros, pêlos de animais, produtos químicos e pólenes na atmosfera, como a asma e rinite alérgica (Behrendt e Becker, 2001; Sofiev et al., 2006), estão a aumentar severamente, sobretudo nos países mais desenvolvidos e representam um dos principais problemas clínicos da actualidade, afectando cerca de 25% da população (Weerd et al., 2002; Sofiev et al., 2006; Ribeiro et al., 2009).

Nos países europeus, os aerolergénios polínicos mais abundantes na atmosfera pertencem às famílias Poaceae, Betulaceae e Oleaceae. Para além das gramíneas, a polinização da oliveira (pertencente à família Oleaceae) é uma das maiores causas da alergia respiratória nos países mediterrânicos, onde se inclui Portugal (Tereja et al., 1999). Mais de 70% dos alérgicos ao pólen de oliveira apresentam sensibilidade a *Ole e1*, a glicoproteína mais abundante do grão de pólen e o alergénio que mais significativamente contribui para o grau de alergenicidade deste pólen (Tereja et al., 1999; González et al., 2002).

Hoje em dia a determinação da exposição aos alergénios baseia-se na contagem polínica obtida por sistemas de captação volumétricos. Contudo, existem evidências de que a carga alérgica do grão de pólen pode variar de acordo com factores geográficos, climatéricos e também sazonais. A determinação da variação da concentração de alergénio constituiria uma medida mais precisa da exposição aos agentes causadores da alergia. Porém, não existem actualmente metodologias certificadas implementadas para a quantificação de alergénios polínicos.

Assim, a realização deste trabalho teve como objectivos principais o desenvolvimento de métodos fiáveis para captação e quantificação do aeroalergénio *Ole e1* em amostras de ar atmosférico exterior, para o que se apostou num método ELISA, bem como averiguar a existência de correlação entre *Ole e1* e as contagens polínicas obtidas pela metodologia certificada actualmente vigente assente em tecnologias volumétricas de tipo Hirst.

3. Objetivos Científicos

O presente trabalho teve como principal objectivo o desenvolvimento de novas metodologias que possam complementar as actuais e contribuir para uma mais eficiente previsão de risco de alergia respiratória causadas por aeroalergénios, em particular *Ole* e1 presente no grão de pólen de oliveira.

Especificamente pretende-se:

- ✓ Estabelecer um método fiável para quantificação do alergénio *Ole* e1;
- ✓ Averiguar a dimensão dos bioaerossóis que transportam o alergénio *Ole* e1;
- ✓ Determinar o perfil de distribuição de aeroalergénio ao longo das estações polínicas de 2009 e 2010;
- ✓ Averiguar a correlação entre o conteúdo atmosférico do aeroalergénio *Ole* e1 e das contagens polínicas obtidas pela metodologia certificada actualmente vigente;
- ✓ Determinar o conteúdo médio de *Ole* e1 por grão de pólen;
- ✓ Averiguar a variabilidade sazonal do conteúdo em alergénio *Ole* e1 do pólen;
- ✓ Averiguar a influência de parâmetros ambientais, como a temperatura e a precipitação, na distribuição de pólen e *Ole* e1 ao longo da estação polínica.

4. Materiais e Métodos

4.1 Recolha de Partículas Presentes no Ar Atmosférico

O conteúdo polínico atmosférico da *Olea europaea* e de alergénio *Ole e1* foram monitorizados em simultâneo e diariamente durante a estação polínica mediante a utilização de um colector volumétrico do tipo “Hirst” (versão comercial Burkard Seven Day Recording Volumetric Spore Trap[®]) e de um colector de impacto de médio volume (CHEMVOL-Sampler), ambos colocados numa plataforma meteorológica localizada no Colégio Luís António Verney, no centro da cidade de Évora, a 17 m acima do nível do solo e 320 m acima do nível do mar distanciados cerca de 5 m (figura 8).

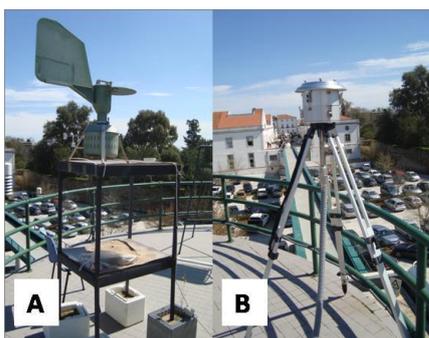


Figura 8: A – Polinómetro Hirst; B – Colector CHEMVOL-Sampler.

4.1.1 Recolha de Grãos de Pólen

A descrição deste tipo de colector foi atrás referida (ver secção 1.3.1).

4.1.1.1 Mudança do Tambor Rotativo do Polinómetro Hirst

Antes de se proceder à troca do tambor rotativo com a cinta de Melinex, o colector volumétrico do tipo “Hirst” foi desligado, bloqueou-se o cata-vento e com um objecto pontiagudo marcou-se o final da amostragem. Depois, abre-se a cabeça do colector e retira-se do seu interior o tambor que foi rapidamente guardado numa caixa apropriada e substituído por um novo tambor. O início da amostragem foi marcado com um objecto pontiagudo, o cata-vento foi desbloqueado e por fim o colector volumétrico do tipo “Hirst” foi de novo ligado.

O tambor gira por acção a um mecanismo de relojoaria, a uma velocidade de 2 milímetros por hora.

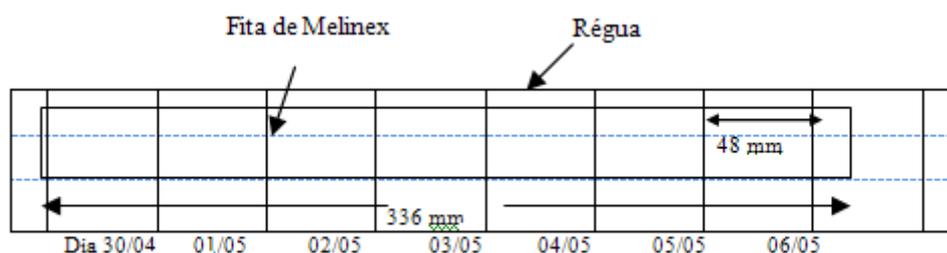
Todas as operações realizadas durante mudança do tambor foram rápidas e numa posição contrária à direcção do vento de modo a minimizar as contaminações. Os tambores foram substituídos semanalmente sempre à mesma hora.

4.1.1.2 Processamento das Fitas

A fita de Melinex tem cerca de 336 mm de comprimento que corresponde aos 7 dias da semana e ao cortar-se a fita em 7 fragmentos todos iguais obtiveram-se amostras diárias com cerca de 48 mm de comprimento. Cada um dos fragmentos foi colocado sobre uma lâmina e corado com fucsina básica, que cora os grãos de pólen presentes na amostra. Com a ajuda de um microscópio identificaram-se e quantificaram-se os grãos de pólen presentes na preparação, seguindo o seguinte procedimento (Caeiro, 2004).

A metodologia seguida neste estudo é padronizada pela Rede Portuguesa de Aerobiologia (RPA).

1) Após a desinfecção do material a utilizar com etanol, retirou-se a fita do tambor e colocou-se sobre uma régua transparente apropriada, fabricada para este fim, que vem juntamente com o aparelho de *Hirst*;

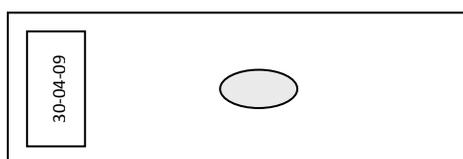


2) Procedeu-se ao corte da fita em 7 fragmentos de 48 mm cada, em que cada um corresponde a 24 horas;

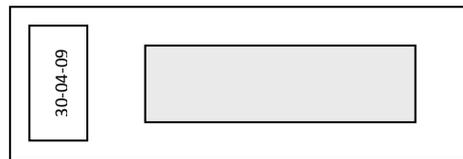
3) Colocou-se a data do lado esquerdo, em cada uma das 7 lâminas, que deve corresponder ao dia da amostra;



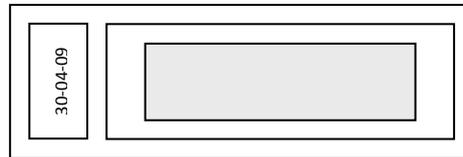
4) Colocou-se uma gota de água no centro da lâmina com o objectivo de aumentar a aderência do fragmento da fita à lâmina;



5) Colocou-se o fragmento previamente cortado sobre a lâmina com a data correspondente;



6) Aplicaram-se 2 a 3 gotas do corante fucsina básica sobre cada um dos fragmentos colocados nas respectivas lâminas, e de seguida colocou-se a lamela;



7) Por fim, limpou-se com etanol o tambor e o "porta-tambor", antes da montagem da nova fita, para eliminar eventuais partículas atmosféricas que possam ter ficado agarradas à estrutura do tambor e "porta-tambor" e, desta forma, prevenir uma eventual contaminação da amostra seguinte.

4.1.1.3 Análise Quantitativa da Amostra

Dado que a identificação e quantificação das partículas polínicas ocorrem num longo período de tempo, normalmente realiza-se uma sub-amostragem na preparação das amostras de modo a facilitar a sua leitura. Existem vários métodos de leitura, mas neste trabalho utilizou-se o sistema das 4 linhas longitudinais, desenvolvido pelo departamento de Biologia Vegetal da Universidade de Córdoba para a REA mas hoje adoptado pela maioria das redes aerobiológicas europeias e consiste em percorrer na horizontal 4 linhas no centro da lâmina, utilizando-se uma ampliação de 400x (ocular de 10x e objectiva de 40x), o que significa que se lê aproximadamente cerca de 13 % da preparação (Caeiro, 2004).

Desta forma e inicialmente, recortou-se um segmento da folha de acetato da dimensão de uma lâmina de microscópio, traçaram-se 24 linhas transversais no segmento da folha de acetato, separadas entre si por 2 mm e colocou-se o segmento sob a lâmina, o primeiro intervalo de 2 mm entre as primeiras 2 linhas representa a hora do dia em que se iniciou a recolha das partículas transportadas pelo ar. O intervalo entre as linhas corresponde a uma hora de amostragem. Depois, assumindo-se que as partículas polínicas estão uniformemente distribuídas ao longo da fita, marcaram-se 4 pontos ao centro, próximos da primeira linha do acetato, colocou-se a objectiva sobre um dos pontos, percorreu-se os 48 mm de cada amostra diária ao longo da lâmina (como se se traçasse um linha longitudinal com a objectiva) e repetiu-se este processo para os três outros pontos marcados. Por cada 2 mm (uma hora de

amostragem) da linha percorrida registaram-se os grãos de pólen identificados e a sua respectiva quantidade numa tabela de registo de dados. Após a leitura, calcularam-se os totais para cada um dos tipos polínicos encontrados e os dados obtidos são estimativas dos verdadeiros valores. Por fim, converteram-se os dados a grãos de pólen por metro cúbico utilizando a seguinte equação:

$$N.^\circ \text{ grãos pólen/m}^3 = N.^\circ \text{ total pólen} \times \frac{\text{Comp.da fita} \times \text{Largura da fita}}{(\text{Medida do campo óptico} \times \text{Comp.da fita} \times N.^\circ \text{ de linhas}) \times \text{Fluxo de ar}} \quad (1)$$

Onde:

$$N.^\circ \text{ de grãos de pólen/m}^3 = N.^\circ \text{ total de pólen} \times 0,54$$

$$\text{Comp. da fita} = \text{Comprimento do segmento da fita} = 48 \text{ mm}$$

$$\text{Largura da fita} = \text{Largura do segmento da fita} = 14 \text{ mm}$$

$$\text{Medida do campo óptico} = 0,45 \text{ mm}$$

$$N.^\circ \text{ de linhas} = 4$$

$$\text{Fluxo de ar} = 10\text{L/min} = 14400 \text{ L/dia} = 14,4 \text{ m}^3$$

Os resultados obtidos foram produzidos no Lab. Palinologia e Aerobiologia da Universidade de Évora e cedidos pela SPAIC que detém a tutela da Rede Portuguesa de Aerobiologia.

4.1.1.4 Análise Qualitativa da Amostra

Para a identificação dos diversos tipos polínicos utilizou-se como apoio alguma bibliografia da especialidade: Abello (1980), Moore *et al.* (1991), Smith (1984), Smith (1986), Reille (1992) e Arias *et al.* (2002). Identificaram-se os grãos de pólen da oliveira.

4.1.2 Recolha do Aeroalergénio Ole e1

O CHEMVOL-Sampler (figura 8-B) encontra-se ligado a uma bomba digital DHM 60 com um fluxo de 800 litros por minuto, ficando as partículas (P) presentes no ar atmosférico retidas em dois filtros de poli-uretano de tamanhos diferentes (XL e M), e que se encontram no interior da campânula que constitui o colector. As partículas (P) ficam retidas nos filtros de acordo com as suas dimensões, $P > 10 \mu\text{m}$ ficam retidas no filtro XL enquanto $10 \mu\text{m} > P > 2,5 \mu\text{m}$ ficam no filtro M.

4.1.2.1 Preparação dos Filtro de poli-uretano para Utilização no CHEMVOL-Sampler

De modo a evitar falsos positivos durante a quantificação do aeroalergénio, resultantes de compostos químicos eventualmente existentes nos filtros, estes foram previamente lavados. Foram colocados em recipientes contendo tampão Bicarbonato de Amónio 0,1M (pH 8,11) (Sigma-Aldrich) e postos a agitar durante 1 hora a 6 rotações por minuto (rpm), depois foram mergulhados 3 vezes em água bidestilada. Por fim, colocaram-se, novamente, os filtros em recipientes limpos com água bidestilada durante uma hora e sujeitos a agitação (6 rpm), sendo posteriormente colocados numa estufa a 37°C durante 4 dias.

Os filtros lavados foram armazenados em sacos devidamente identificados (data, n.º do filtro, alergénio(s) a quantificar, local da recolha) até à data de utilização. Durante todo o processo de lavagem e armazenamento evitou-se a exposição dos filtros à luz solar uma vez que a radiação os pode danificar.

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

Para trocar os filtros de poli-uretano onde ficou retido o aeroalergénio, desligou-se a bomba digital DHM 60 do Chemvol-Sampler e retirou-se a campânula do tripé que a suporta. Esta foi colocada numa bancada, e as duas partes que a compõem foram separadas de modo a ficarem visíveis os arcos de metal que suportam os filtros XL e M.

Os arcos foram, então, retirados, ficando os filtros descobertos. Assim, utilizando-se luvas e com o auxílio de pinças, retiraram-se os filtros sendo depois divididos em três partes e cada uma foi colocada em tubos de Falcon de 50 mL devidamente identificados com o número do filtro, o nome dos alergénicos a quantificar, o local de recolha, a data em que o filtro foi colocado no Chemvol-Sampler e armazenados a -80°C (figura 9).



Figura 9: Substituição dos Filtros XL e M do colectador de impacto CHEMVOL-Sampler.

Os novos filtros foram igualmente manuseados com pinças e luvas e foram colocados no interior da campânula. Encaixaram-se as duas partes da campânula e esta foi colocada no tripé, ligando-se por fim a bomba digital DHM 60. Os filtros foram substituídos a cada 24 horas de utilização, às doze horas.

4.1.2.3 Extracção da Fracção Proteica e Preparação dos Extractos

O conteúdo proteico existente nos filtros foi extraído utilizando-se tampão Bicarbonato de Amónio 0,1 M (pH 8.1) suplementado com 0,1% de BSA (Sigma).

Foram adicionados 15 e 6 mL aos tubos Falcon que continham os filtros XL e M, respectivamente, e estes foram submetidos a agitação por inversão num *Rotating head-over-head* a 60 rpm durante 4 horas e protegidos da luz (figura 10).

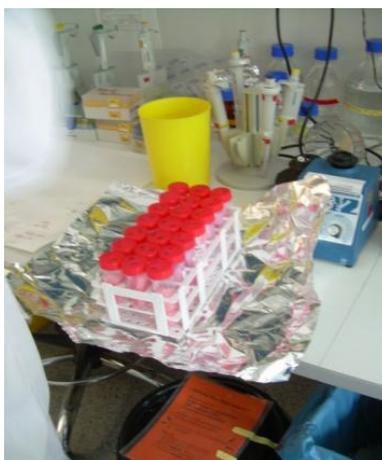


Figura 10: Preparação dos tubos de Falcon contendo os filtros para a extracção.

Após este período, os tubos foram centrifugados a 1000 *g*, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Depois, transferiu-se o sobrenadante para tubos de Falcon de 15mL e procedeu-se a nova centrifugação, 4000 *g*, durante 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi aliqotado de acordo com as seguintes condições:

- ✓ Filtros XL: 4 aliqotas de 2,5 mL às quais foram adicionados 2 µL de BSA 10% e 2 aliqotas de 2 mL, sem BSA.
- ✓ Filtros M: 2 aliqotas de 2,5 mL, às quais foram adicionados 2 µL de BSA 10%.

As aliqotas foram armazenadas a -80°C e submetidas a liofilização durante 48 horas. O liofilizado foi armazenado até à análise a -80°C.

4.1.2.4 Quantificação do Aeroalergénio *Ole* e1

O aeroalergénio *Ole* e1 foi quantificado utilizando um método ELISA *sandwich* assimétrico, baseado na captura do *Ole* e1 com anticorpos monoclonais e na sua detecção com anticorpos policlonais.

I. Ligação do anticorpo à fase sólida

O ensaio iniciou-se com o revestimento dos poços das microplacas de poliestireno com uma solução contendo o anticorpo monoclonal 5A3 *anti-Ole* e1 (2,5 ng/mL) (Bial) diluído em tampão de revestimento pH 7,3 (solução salina de fosfatos (PBS)).

A primeira etapa consistiu na adição de 100 µL da solução de anticorpo a cada compartimento da placa, seguindo-se um período de incubação *overnight* a 4°C.

II. Lavagem das placas

A etapa de lavagem teve como objectivo remover as partículas e anticorpo que não ficaram adsorvidas à fase sólida. O procedimento experimental envolveu, normalmente, três lavagens dos poços entre cada etapa com solução salina de fosfato com 1% de Tween (PBS-T) (figura 11). Após a lavagem, as placas foram invertidas sobre papel absorvente de forma a eliminar a totalidade da solução de lavagem.



Figura 11: Lavagem das microplacas.

III. Saturação da placa com BSA

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

IV. Ligação do antigénio

Após a etapa de saturação e da lavagem das placas, procedeu-se à aplicação de soluções contendo antigénio, proteína *O/e* e1 existente nas amostras e nos padrões, que se liga ao anticorpo imobilizado na fase sólida.

Preparou-se uma curva padrão, recorrendo-se a uma série de diluições sucessivas obtendo-se concentrações correspondentes a 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78; 0,39; 0,2; 0,1 ng/mL a partir de um padrão de *O/e* e1 purificado (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Bial).

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

A preparação dos padrões, amostras e dos controlos efectuaram-se utilizando tampão de diluição, PBS-T suplementado com 1% de BSA.

Foi também preparado um controlo negativo que consistiu em poços onde não foi adicionado o anticorpo de detecção e, portanto, independentemente da presença ou não de antigénio, não deverá formar-se o produto da reacção. Este passo permite averiguar a ocorrência de reacções inespecíficas.

Adicionaram-se 100 μL das amostras, dos padrões e controlos positivos aos compartimentos da microplaca de acordo com o esquema 1. As placas foram incubadas a 37 °C durante uma 1 hora.

Esquema 1: Esquema das microplacas utilizadas nos ensaios ELISA em que A1-A10 corresponde às diferentes amostras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Padrões										Branco	
B												
C	A1			A2			A3			A10	Controlo negativo	
D												
E	A4			A5			A6				Controlo Positivo A	
F												
G	A7			A8			A9			Controlo Positivo B		
H												

V. Adição do Anticorpo Secundário

A etapa de detecção consistiu na adição de 100 μL de uma solução de anticorpo de detecção policlonal marcado com biotina ($0,1 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$; Bial) em tampão de diluição. Ocorrendo um período de incubação de 1 hora a 37°C .

VI. Adição do enzima estreptavidina-peroxidase

Nesta etapa, após remoção do excedentes lavagem das placa, adicionou-se a cada compartimento da placa 100 μL de um conjugado contendo o enzima o enzima que permite a detecção, estreptavidina-peroxidase (POX) ($0,250$ ng/mL ; Sigma). A incubação desta etapa ocorreu nas mesmas condições que as anteriores.

VII. Adição do Substrato e Paragem da Reacção

As microplacas foram lavadas de modo a remover o excesso de enzima e posteriormente adicionaram-se 100 μL do substrato Tetra-metilbenzidina (TMB) (Sigma) que após oxidação origina um produto corado de azul. Aguardaram-se 10 minutos e parou-se a reacção com ácido sulfúrico (1,5M), verificando-se alteração da cor da solução de azul para amarelo. O produto da reacção foi quantificado por espectrometria de absorção molecular, determinando a absorvância a 450 nm (figura 12).

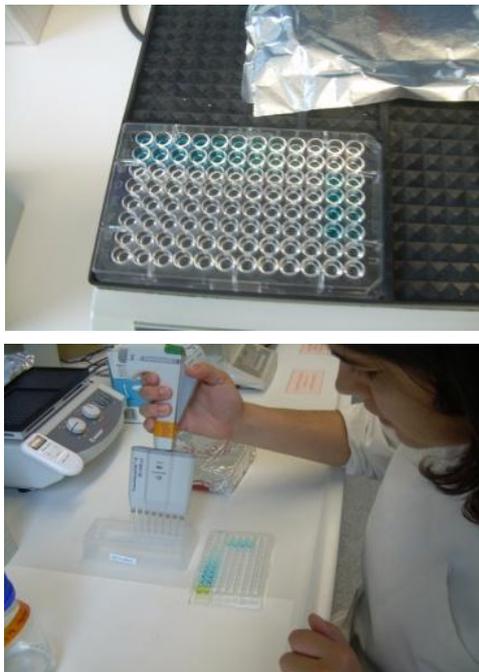


Figura 12: Obtenção do produto a reacção, após a adição de TMB e paragem da reacção.

4.1.2.4.1 Análise de Resultados

A determinação das concentrações de *Ole e1* efectuou-se por interpolação na curva sigmóide ajustada aos pontos da curva construída com os padrões de *Ole e1* purificado e multiplicou-se pelo factor de diluição com o qual a amostra foi preparada.

Dado que a concentração obtida a partir desta se refere ao aeroalergénio existente num poço da microplaca de ELISA (100 μ L), torna-se necessário convertê-la para a quantidade total de alergénio extraído dos filtros do CHEMVOL-Sampler utilizando-se a equação 2:

$$[Ole e1](pg/mL) = \frac{[Ole e1](ng/mL)}{f_d \times V_e \times 3} \quad (2)$$

1,155

Onde:

f_d – Factor de diluição = 10;

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

3 – Número de partes num filtro;

1,155 – Volume de ar que passa no filtro (m^3).

Os resultados encontram-se apresentados em picogramas por metro cúbico de ar capturado pelo colector (pg/m^3).

Para a avaliação do significado estatístico da diferença entre os valores médios de grupos de resultados, foi utilizado os parâmetros média, desvio-padrão, bem como o teste de análise de variância segundo o método ANOVA para um nível de significância 0,05 (ver anexo).

5. Resultados e Discussão

Em Portugal, como em toda a bacia mediterrânica, o pólen de *Olea europaea* constitui uma das principais fontes de aeroalergénios polínicos atmosféricos e naturalmente uma das principais causas da alergia respiratória (Tejera *et al.*, 1999).

As tecnologias actualmente utilizadas para efectuar a previsão de risco de exposição ao alergénio têm por base as contagens polínicas. Contudo, sabe-se que a carga alergénica por grão de pólen pode variar significativamente de acordo com as condições atmosféricas. Assim, o desenvolvimento de novas estratégias e metodologias que possam contribuir para complementar os dados polínicos com a quantificação de alergénio são muito relevantes.

5.1 Captação e Quantificação do Aeroalergénio *Ole e1*

A quantificação do *Ole e1* implicou o desenvolvimento e implementação de um método ELISA *sandwich*.

Este tipo de ensaio foi o escolhido, uma vez que, para além de permitir a análise de extractos totais e amostras impuras, foi anteriormente utilizado por outros autores para quantificação de outras proteínas alergénicas (Buters *et al.*, 2010) e até mesmo do alergénio *Ole e1*, mostrando-se bastante sensível e reprodutível (Arrila *et al.*, 2002).

5.1.1 Padronização de um Método ELISA *Sandwich* Fiável para Quantificação do Aeroalergénio *Ole e1*

A padronização do método utilizado para quantificação do alergénio *Ole e1* em amostras de ar atmosférico exterior consistiu uma etapa indispensável neste trabalho, onde se avaliou, por um lado, a reprodutibilidade dos ensaios ELISA e, por outro, o rigor dos valores obtidos.

Em cada ensaio foi sempre preparada uma curva de calibração utilizando soluções padrão de *Ole e1* purificado (como descrito nos métodos, na secção 4.1.2.4). A figura 13 mostra um exemplo de curva de calibração típica em que os pontos experimentais foram ajustados a uma sigmóide log-logística (equação 3) utilizada posteriormente para a determinação da concentração das amostras.

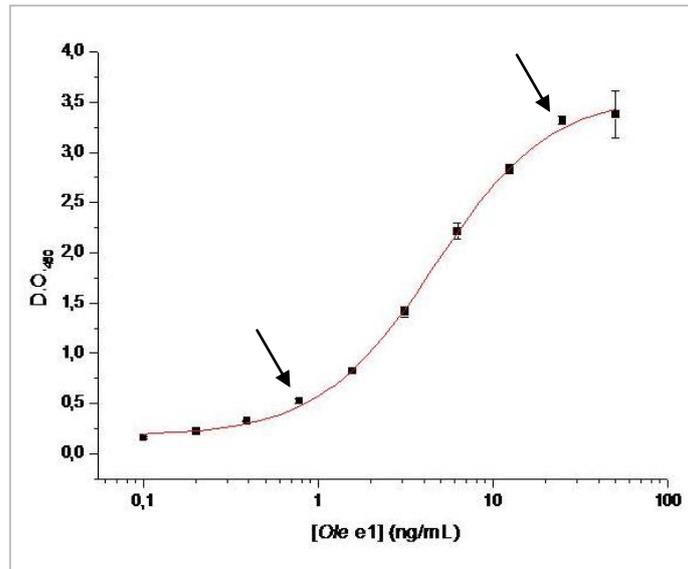


Figura 13: Curva de Calibração para *Ole e1* representativa de 18 ensaios realizados. Os padrões foram preparados por diluições do padrão de *Ole e1* 50ng/mL com tampão PBS-T 1% BSA. Parâmetros determinados no ajuste sigmoide: $A_1=0,177$; $A_2= 3,575$; $X_0=4,637$ e $p=1,318$.

A figura 13 mostra uma curva de calibração representativa das que foram realizadas. Todas as curvas sigmóides foram similares tendo a absorvância variado entre 0,1 e 2,5, utilizando soluções padrão cujas concentrações variaram no intervalo 0,1 ng/mL a 50 ng/mL. Os limites mínimo e máximo de sensibilidade para quantificação do *Ole e1* foram usualmente de aproximadamente 1 ng/mL a 25 ng/mL, que correspondeu à zona de maior declive da curva de calibração (figura 13, indicado com setas).

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2 \quad (3)$$

Onde:

y – Absorvância

A_1 – Absorvância mínima curva;

A_2 – Absorvância máxima da curva;

x – Concentração de alérgénio a determinar

x_0 – Concentração de alérgénio correspondente ao ponto médio da curva (ponto de inflexão);

p – declive.

A equação da curva sigmóide logística ajustada (equação 3) permitiu determinar por interpolação dos valores que se encontram nos intervalos de absorvância correspondentes à zona de maior declive da curva, pois acima ou abaixo destes limites o método não tem sensibilidade.

Para avaliar a reprodutibilidade e exactidão do método foram ainda utilizados controlos positivos com concentração conhecida (1 e 10 ng/mL) e que se situam no intervalo de sensibilidade da curva de calibração. A figura 14 mostra os resultados obtidos em todos os ensaios realizados correspondentes à análise das estações polínicas 2009 e 2010.

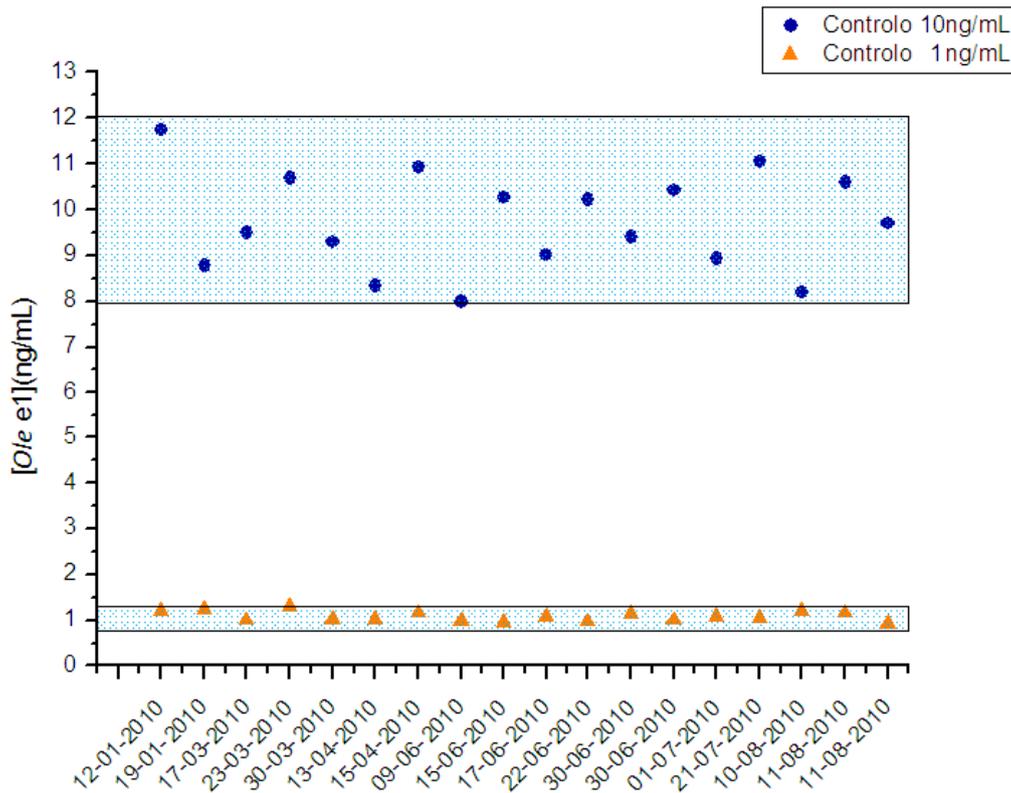


Figura 14: Variação da concentração dos controlos positivos nos ensaios realizados.

Os valores médios obtidos experimentalmente foram de $9,73 \pm 1,05$ e $1,08 \pm 0,11$ ng/mL para o controlo positivo maior ou menor concentração, respectivamente. Considerando aceitável uma variação de 20% sobre os valores médios obtidos, indicados pelas zonas a sombreado na figura 14, é de realçar que todos os valores se encontraram nesse intervalo. Para além disso, os valores médios encontrados são diferentes dos valores teóricos previstos em apenas 2,89% e 8,76% e a variabilidade entre os diferentes ensaios foi de 10,74% e 9,89% para os controlos de maior e menor concentração, respectivamente.

Assim pode afirmar-se que o método foi rigoroso e reprodutível, sendo considerado um método adequado à quantificação de Ole e1 nas amostras.

5.2 Determinação do Conteúdo Atmosférico em Grãos de Pólen de Oliveira

A análise microscópica das fitas de Melinex permitiu determinar a data inicial e final das épocas polínicas e definir o perfil polínico da Oliveira em 2009 e 2010 que se encontra apresentado na figura 15.

Embora não exista nenhum critério uniforme para determinar as datas inicial e final da estação polínica, pois são diversas as metodologias utilizadas para este fim, um dos métodos frequentemente utilizado para as determinar foi sugerido por Gálan *et al.* (2001) e define o início da estação polínica como a data em que se regista 1 grão de pólen/m³ de ar/24h de ar e nos cinco dias seguintes se verificasse uma concentração de grãos de pólen igual ou superior ao primeiro dia.

Contudo, este método foi adaptado em particular à Oliveira, devido ao carácter curto e intenso da sua polinização.

Assim para esta árvore, o início da estação polínica é considerado como aquela data em que se registou uma concentração igual ou superior a 5 grãos de pólen de Olea/m³ de ar/24h, mas com a condição de que nas seguintes datas, pelo menos cinco dias sucessivos, se observe uma tendência crescente na quantidade polínica. Como data final, considera-se o último dia em que se registaram 5 grãos de pólen/m³/24h de ar, com a condição de que nos dias seguintes (pelo menos três) se observe uma tendência decrescente dos registos polínicos.

Analisando as figuras verifica-se que a época polínica ocorreu em 2009 entre 30 de Abril e 7 de Junho enquanto em 2010 teve início em 6 de Maio e terminou 22 de Junho. De um modo geral, os períodos polínicos da oliveira nos dois anos em estudo aconteceram entre Maio e Junho, tal como acontece em Espanha e na Turquia (Florido *et al.*, 1999; Kirmaz *et al.*, 2005).

Os dois perfis polínicos apresentaram algumas diferenças. Em 2009 (figura 15-A), a polinização da *Olea europaea* ocorreu durante todo o mês de Maio, existindo um período inicial, correspondente aos primeiros dias do mês, em que a quantidade de grãos de pólen na atmosfera atinge um valor máximo de 1399 grãos de pólen/m³ de ar/24h no dia 9 de Maio.

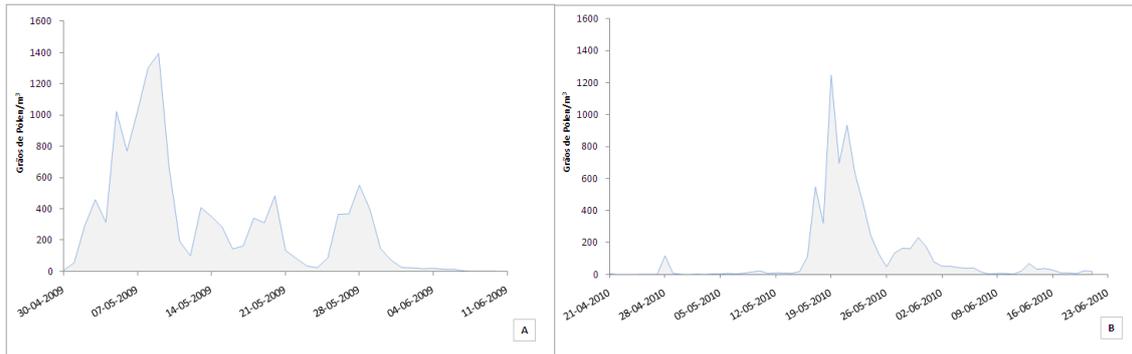


Figura 15: Perfis polínicos de 2009 (A) e 2010 (B).

Após esta data, a quantidade polínica diminuiu, seguindo-se um período da época polínica, compreendido entre 12 e 21 de Maio, em que a quantidade de pólen ao variar entre 100 e 409 grãos de pólen/m³ de ar/24h. Durante o período de 22 a 25 de Maio, ocorre um decréscimo no número de pólenes para valores compreendidos entre 55 a 87 grãos de pólen/m³ de ar /24h, voltando a aumentar depois de dia 26 para 367 grãos de pólen/m³ de ar /24h até ao dia 28 de Maio em que a concentração polínica correspondeu a 554 grãos de pólen/m³ de ar/24h. Após dia 31 de Maio a quantidade de pólenes foi inferior a 72 grãos de pólen de oliveira/m³ de ar/24h.

Em 2010 (figura 15-B), o período polínico correspondeu essencialmente a um curto e intenso período que foi compreendido entre 16 e 31 de Maio, apresentando um pico que atingiu um valor máximo de 1249 grãos de pólen/m³ de ar/24h no dia 19 de Maio. Este perfil polínico é característico desta espécie como descrito em Florido *et al.* (1999).

Nesta época polínica, é importante realçar a existência de um pico isolado no dia 28 de Abril, anterior ao início da estação polínica (6 de Maio, segundo o critério anteriormente referido) onde se registou uma concentração de 117 grãos de pólen/m³ de ar/24h, elevada quando comparada com a obtida no restante período que antecedeu o início da época polínica de 2010. Esta situação ter-se devido a fenómenos de transporte a longa distância justificada pela subida da velocidade média do vento nos dias que antecederem esta data acoplada ao aumento repentino da temperatura média do ar e à ocorrência de um período de precipitação reduzida (dados apresentados na secção 5.5).

A quantidade total de grãos de pólen nas épocas polínicas de 2009 e 2010 foi de 12523 grãos de pólen/m³ de ar/24h e 7136 grãos de pólen/m³ de ar/24h, respectivamente.

5.3 Quantificação do Aeroalergénio *O/e* e1 nos filtros XL e M

O teor atmosférico do alergénio *O/e* e1 foi monitorizado utilizando-se o colector de impacto de médio volume CHEMVOL-Sampler. Este encontra-se ligado a uma bomba digital que aspira o ar, ficando as partículas retidas nos filtros de poli-uretano XL e M que se encontram no seu interior. As partículas com tamanho superior a 10 μm ficaram retidas no filtro XL enquanto o filtro M retém as partículas com dimensões compreendidas entre 2,5 μm e 10 μm .

A fracção proteica retida nos filtros foi extraída e as amostras tratadas como descrito na secção 4.1.2.3, e a concentração de *O/e* e1 foi determinada recorrendo-se ao método ELISA *sandwich* descrito na secção 4.1.2.4.

A figura 16 mostra a distribuição do alergénio encontrada nos filtros M e XL ao longo das duas épocas polínicas estudadas. Pode observar-se que as partículas transportadoras do aeroalergénio *O/e* e1 ficam maioritariamente retidas no filtro XL, onde se registaram concentrações mais elevadas de *O/e* e1, independentemente do momento das estações polínicas em análise.

O conteúdo polínico retido pelo filtro XL e M em 2009 foi de 83% \pm 10,43% e de 17% \pm 10,43%, respectivamente. Em 2010 obtiveram-se dados semelhantes, tendo-se observado que a quantidade de alergénio determinada foi 89% \pm 7,67% no filtro XL e 11% \pm 7,67% no filtro M, respectivamente.

Para além disso, quando analisados em conjunto, observou-se que existe uma correlação positiva (declive=0,05, $r^2=0,426$ e declive=0,07, $r^2=0,731$, em 2009 e 2010, respectivamente; $p<0,001$) entre as concentrações de alergénio determinadas nos filtros XL e M (figura 16-B), mostrando que a proporção de alergénio retido nos filtros M e XL se manteve aproximadamente constante durante a estação polínica.

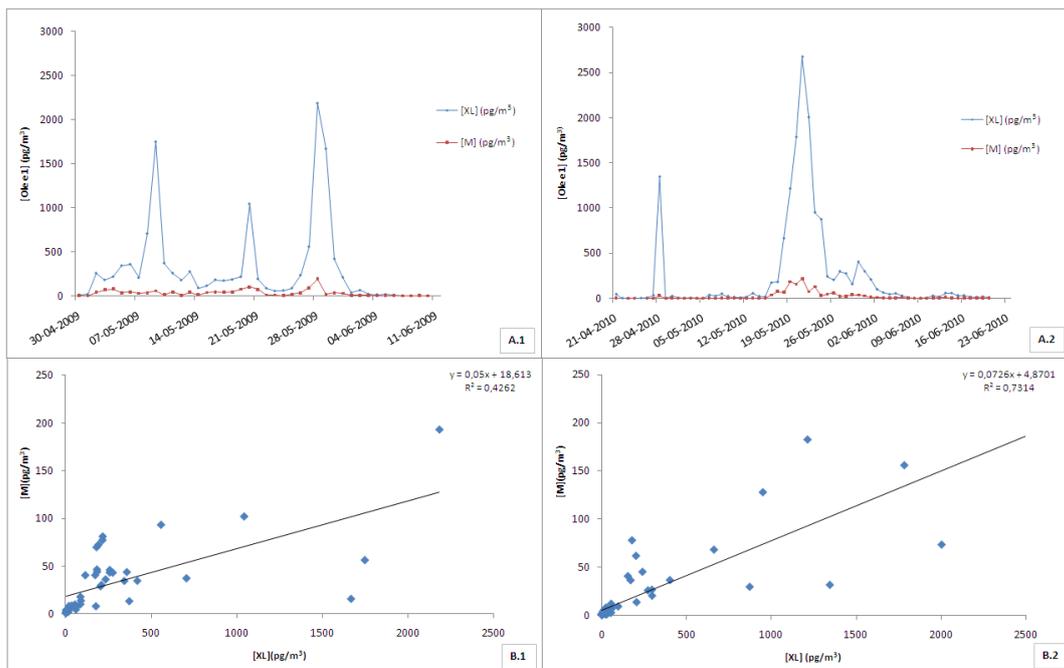


Figura 16: A – Variação da concentração encontrada nos filtros M e XL durante 2009 (1) e 2010 (2). B – Correlação entre a concentração determinada a partir do filtro XL e M em 2009 (1) e 2010 (2) ($p < 0,001$).

Por outro lado, a figura 17 mostra a variação da razão M/XL ao longo da época polínica e também em função da quantidade de pólen para os anos 2009 e 2010. Pode observar-se que, independentemente de se tratar da época polínica de 2009 ou 2010, a razão M/XL se manteve constante ao longo de toda a estação, evidenciado pela ausência de correlação, sugerindo que o tipo de partículas e a distribuição relativa das mesmas ao longo da estação não sofreu alteração. No que respeita à variação da razão M/XL em função da concentração polínica, observou-se que em 2009 houve uma diminuição dessa razão com o aumento da concentração de pólen ($p < 0,05$) enquanto que em 2010 a razão se manteve constante, independentemente da concentração polínica. À semelhança do que se observou em 2010, seria expectável que em 2009 a recta apresentasse um declive próximo de nulo, pois, como se viu antes (figura 16-B), existe uma correlação significativamente positiva entre o conteúdo em alergénio nos filtros M e o XL. O facto de se ter observado o contrário, poderá ser devido à existência de alguns pontos *outliers* ocorridos no início e final da estação polínica. Não pode excluir-se que, para concentrações elevadas de pólen atmosférico (e recorde-se que simultaneamente à polinização de *Olea* ocorrem muitas outras polinizações nomeadamente a de *Poaceae*) ocorra alguma saturação no filtro M, donde resulte uma diminuição da fracção de alergénio retido no filtro M quando

comparado com o XL (figura 19-A.2). Note-se que a superfície de recolha do M é bastante inferior à do XL e, portanto, este poderá saturar com maior facilidade.

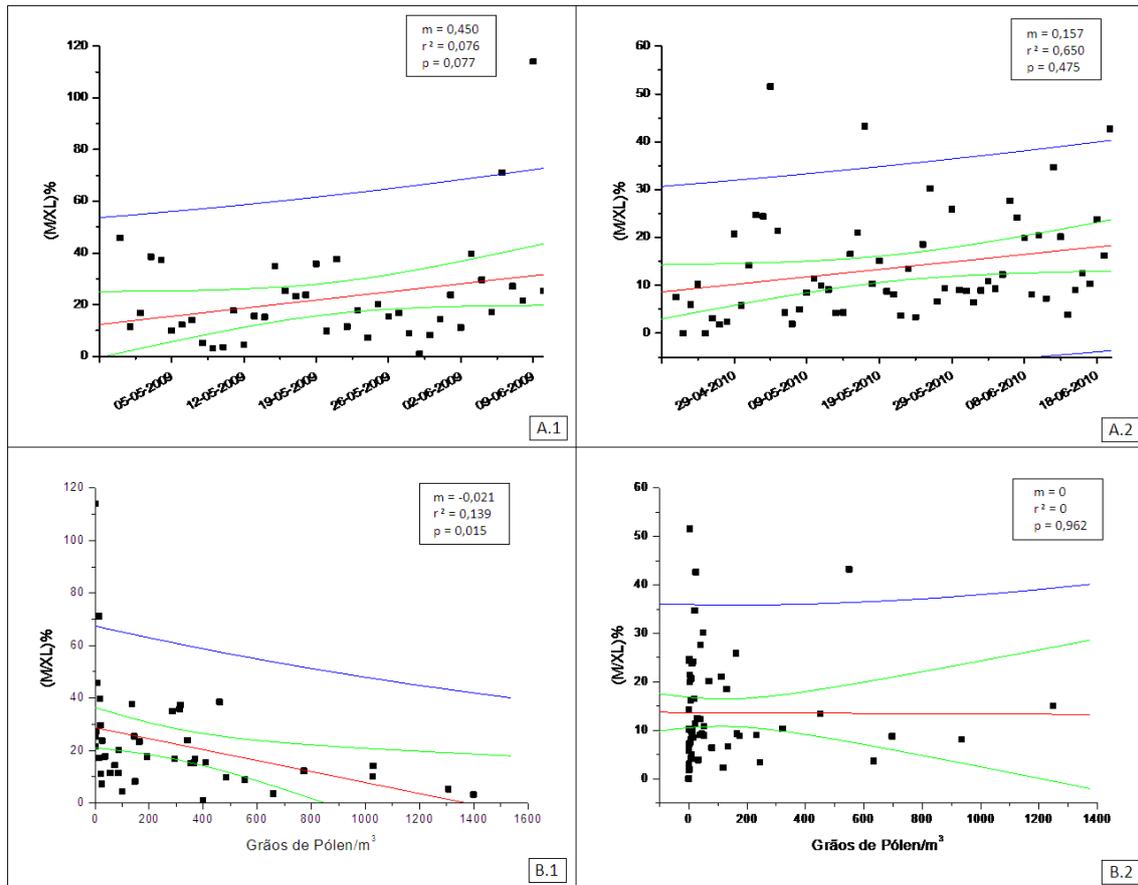


Figura 17: Correlação entre a razão M/XL durante a estação polínica (em cima) e em função da concentração atmosférica de pólen (em baixo).

Pode-se também questionar se os factores meteorológicos não terão um efeito diferencial sobre a quantidade de aeroalergénio presente na atmosfera de tal modo que, no início da estação, este se encontre maioritariamente no interior do próprio grão de pólen e, posteriormente, a sua quantidade vá aumentando na atmosfera em consequência da própria degradação do pólen no ambiente e/ou por acção da precipitação e humidade do ar. A ser verdade, não seria alterada a razão entre os 2 filtros mas justificaria o *outlier* do final da estação polínica (que ocorre logo a seguir a um fenómeno intenso de precipitação) e, por outro, justificaria também a menor eficiência de captação do filtro M no início da estação, pois este apenas recolhe as partículas submicrónicas de *Ole* e1 e Como este estaria maioritariamente no grão de pólen, ficaria maioritariamente retido no filtro XL.

Estes dados sugerem que as partículas transportadoras da glicoproteínas *Ole* e1 apresentam dimensões superiores a $10 \mu\text{m}$. Resultados semelhantes encontram-se

descritos na literatura para o aeroalergénio *Bet v1*, o principal alergénio presente nos pólenes de Bétula (Buters *et al.*, 2010).

5.4 Correlação entre o Conteúdo Atmosférico do Aeroalergénio *Ole e1* e de Pólen

A figura 18 mostra as contagens polínicas médias diárias e o conteúdo total de aeroalergénio diário registado nas estações polínicas de 2009 e 2010.

Em 2009, o perfil em alergénio *Ole e1* caracterizou-se por apresentar três picos que ocorreram aos dias 9, 20 e 28 de Maio e onde os valores de concentração de *Ole e1* corresponderam a 1748, 1043 e 2184 pg/m^3 de ar/24h, respectivamente. Estes picos coincidiram com os picos correspondentes nas contagens polínicas, contudo, a quantidade máxima de aeroalergénio presente no ar atmosférico exterior registou-se no período entre 26 e 31 de Maio enquanto o valor máximo na concentração do pólen se registou no período 2 a 10 de Maio onde se registaram 1399 grãos de pólen/ m^3 de ar/24h (figura 18-A).

Em 2010 (figura 18-B), a curva polínica foi mais condensada apresentando apenas um pico no período de 16 a 31 de Maio. O pico máximo de aeroalergénio, que tomou valor de 2674 pg/m^3 de ar/24h, ocorreu dois dias após se ter registado o número mais elevado de grãos de pólen de toda a estação com 1249 grãos de pólen/ m^3 de ar/24h. Nesta estação ocorreu ainda a existência de um pico isolado correspondente ao dia 28 de Abril em que se verificou uma concentração de *Ole e1* de 1346 pg/m^3 de ar/24h e uma quantidade de grãos de pólen correspondente a 117 grãos de pólen/ m^3 de ar/24h.

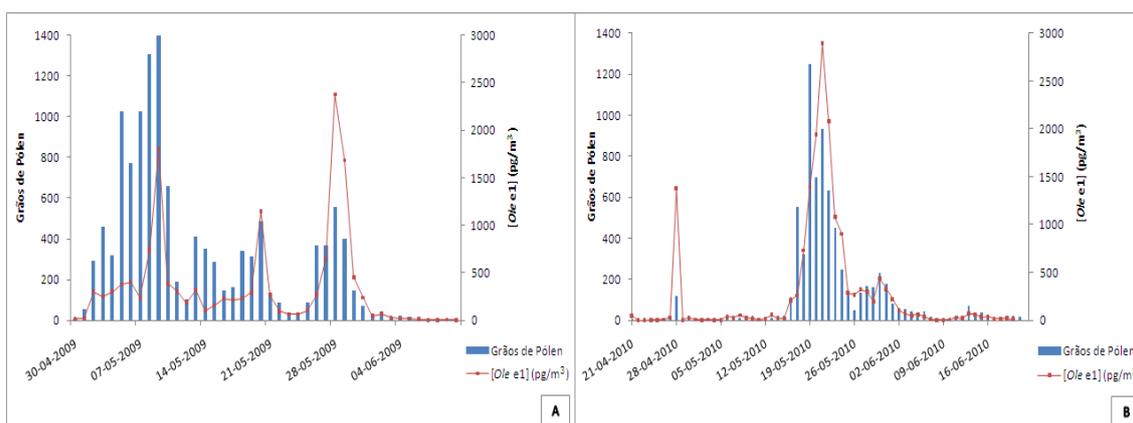


Figura 18: Perfil da curva polínica grão de pólen de Oliveira e conteúdo do aeroalergénio *Ole e1* presente no ar atmosférico exterior nas estações polínicas de 2009 (A) e 2010 (B).

A quantidade total de alergénio nas épocas polínicas de 2009 e 2010 foi de 14503 pg/m³ de ar/24h e de 16286 pg/m³ de ar/24h, respectivamente.

Deve realçar-se que, em ambas as estações polínicas, as contagens polínicas e o conteúdo em aeroalergénio, de um modo geral, apresentam perfis semelhantes, sugerindo a existência de uma correlação entre os dois parâmetros.

O estudo de correlação entre a concentração polínica e de aeroalergénio (figura 19) mostra uma correlação positiva entre os dois parâmetros, tanto para o conteúdo em alergénio em cada um dos filtros isoladamente (Figura 19A e B) como no que respeita à quantidade total de aeroalergénio (Figura 19C) para ambas as épocas polínicas estudadas.

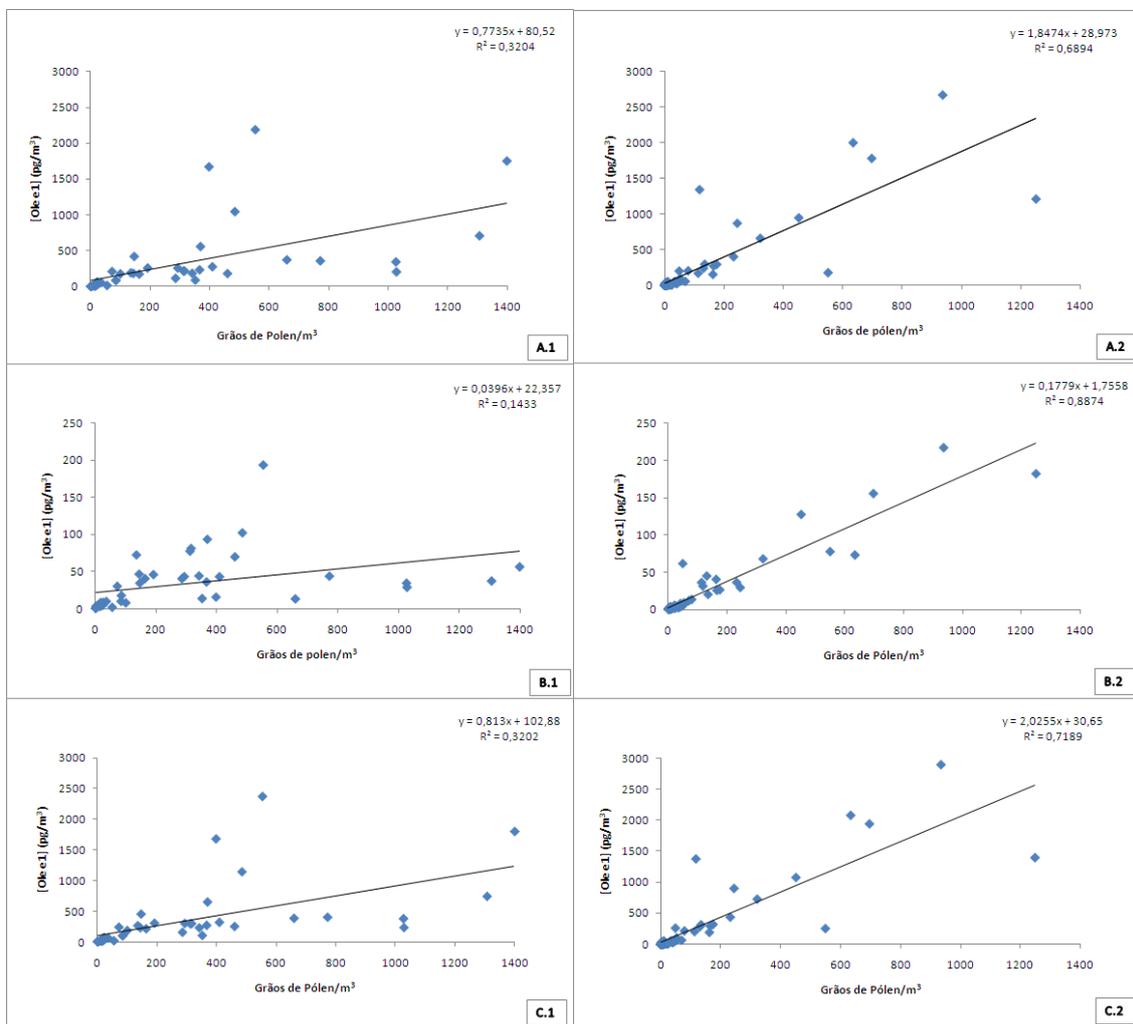


Figura 19: Correlação entre as contagens polínicas e as concentração de *O/e 1* obtidas nos filtro XL (A), M (B) e a concentração total (C) de aeroalergénio presente no ar atmosférico para as épocas polínicas de 2009 e 2010. Todas regressões são significativas, apresentando coeficientes de correlação significativos ($p < 0,05$).

Os coeficientes de correlação (r^2) obtidos variaram entre 0,143 e 0,320 em 2009 e em 0,680 e 0,887 em 2010. Em todos os casos as correlações obtidas foram significativas ($p < 0,05$).

De acordo com os dados apresentados pode-se inferir que o pólen é única fonte de aeroalergénio, o que vai de encontro com o descrito na literatura que indica que as restantes partes da oliveira (fruto, folhas, *etc.*) não contêm *Ole e1* (Linares *et al.*, 2007).

Tendo em conta as regressões lineares obtidas para o conteúdo total de *Ole e1* e nas contagens polínicas pode inferir-se que o conteúdo de *Ole e1* por grão de pólen foi cerca de 0,81 pg em 2009 e em 2010 foi 2,03 pg. Por outro lado, tendo em conta a razão entre o conteúdo total da estação polínica em aeroalergénio e a quantidade total de pólen de estação polínica, obtiveram-se valores semelhantes aos anteriores 1,15 pg e 2,28 pg para 2009 e 2010, respectivamente.

Estes dados mostram que em 2010 a carga alergénica dos grãos de pólen foi cerca de 2 vezes mais elevada que em 2009 sugerindo que, apesar de a estação ter sido mais curta em 2010 e as contagens polínicas máximas terem sido semelhantes às de 2009, o grau de alergenicidade do pólen em 2010 foi maior que em 2009.

Elaborando os histogramas de distribuição de grãos de pólen durante a estação polínicas (figura 20-A) observa-se que, em 2009, 29 dos 39 dias da época polínica apresentaram uma concentração igual ou superior a 50 grãos de pólen/m³ de ar/24h, enquanto em 2010 se registaram apenas 19 dias que apresentaram uma concentração polínica igual ou superior a 50 grãos de pólen/m³ de ar/24h.

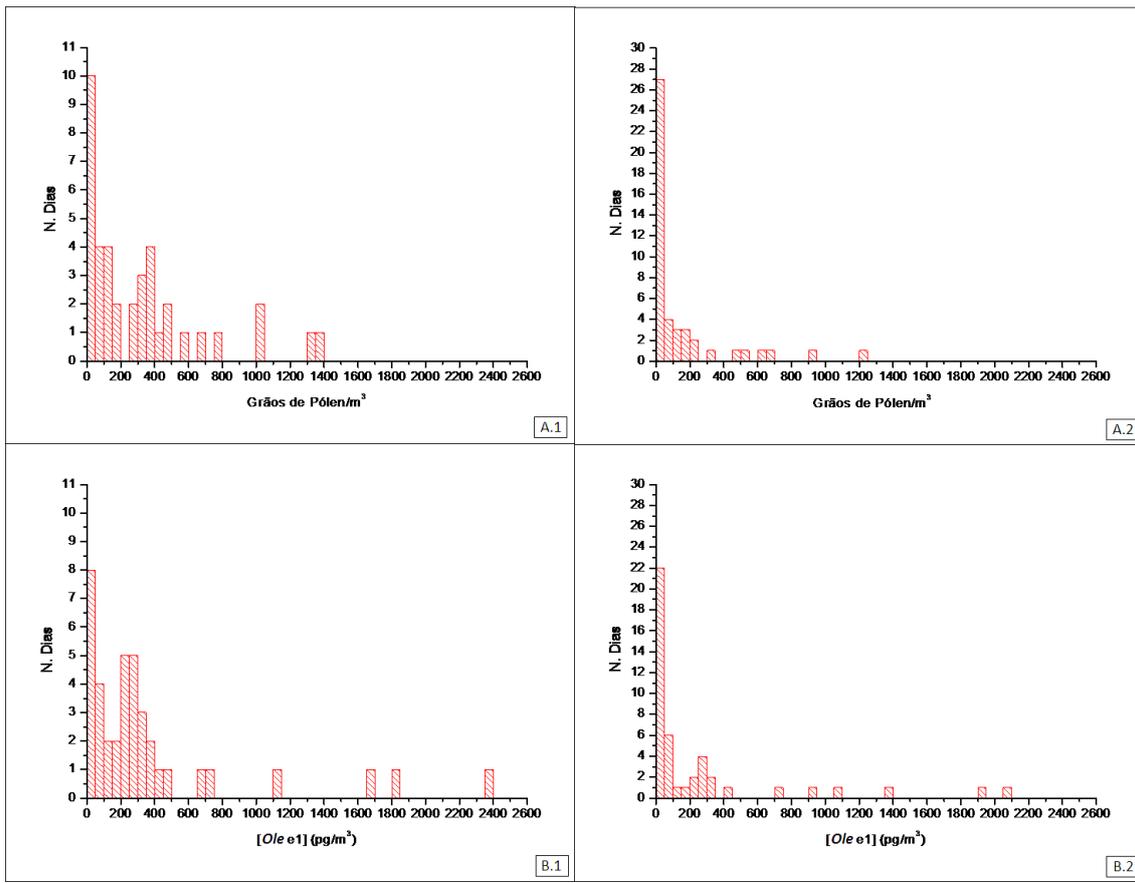


Figura 20: Histogramas de frequências diárias do grão de pólen (A) e de alergénio (B) durante as épocas polínicas de 2009 (1) e 2010 (2).

Dos histogramas de distribuição de alergénio durante as estações polínicas (figura 20-B) verifica-se que, em 2009, 31 dias apresentam uma concentração de alergénio igual ou superior a 50 pg/m^3 de ar/24h e em 2010 foram 23 dias dos 45 que compuseram a época polínica apresentaram concentração de *O/e e1* superior a 50 pg/m^3 de ar/24h.

Sumariamente, apesar de haver, em 2009, um número de dias elevado com índices polínicos superiores a $50 \text{ grãos de pólen/m}^3$ de ar/24h, quando comparado com 2010, quer a quantidade total de *O/e e1* quer a abundância de *O/e e1* no pólen foram mais elevada em 2010. Assim, conclui-se que o pólen, em 2010, teve maior potencial alergénico que em 2009.

5.5 Efeito das Variações Meteorológicas nas Contagens Polínicas e Concentração de O/e e1 Determinada a partir de Amostras de Ar Atmosférico Exterior

Os perfis das curvas polínicas e de aeroalergénio ao longo das duas estações polínicas apresentam variações significativas.

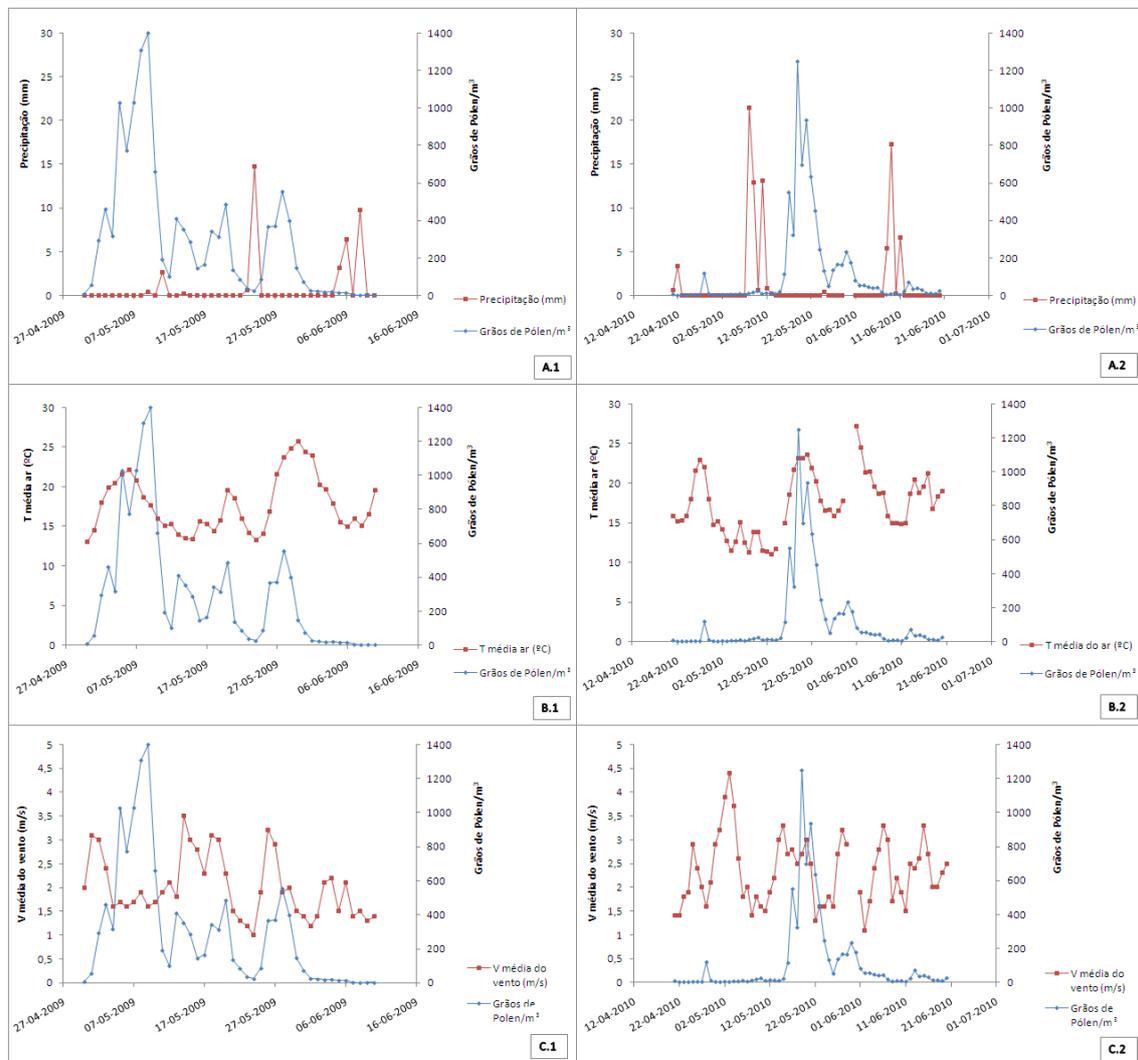


Figura 21: Influência dos parâmetros meteorológicos precipitação (A), temperatura (B) e vento (C) nas concentrações polínicas nas estações polínicas de 2009 (1) e 2010 (2).

Os dados sugerem que a variação das condições climáticas ao longo dos períodos analisados contribuíram de modo semelhante nas duas épocas polínicas estudadas.

A precipitação (figura 21 e 22-A) teve um efeito notório e directo na concentração polínica de alergénio em 2009 e 2010; períodos com níveis elevados de precipitação correspondem a momentos em que a concentração de grãos de pólen e de alergénio é reduzida no ar com valores baixos (< 20 grãos de pólen/ m^3 de ar/24h e $<$

a 70 pg/m³ de ar/24h em 2009 e a 30 grãos de pólen/m³ de ar/24h e 60 pg/m³ de ar/24h em 2010).

Na figura pode observar-se que a diminuição da concentração polínica e de *Ole e1*, evidente, ocorrida entre 22 e 25 de Maio de 2009, período que correspondeu a um pico na precipitação e que o pico polínico característico da estação de 2010 ocorreu num espaço de tempo definido por períodos de chuva intensa.

Por outro lado, as variações da temperatura nos dois anos, 2009 e 2010, (figura 21 e 22-B) têm um efeito contrário ao efeito da precipitação. Períodos em que ocorre um aumento da temperatura corresponderam, a períodos em que se registaram concentrações elevadas de pólen e de aeroalergénio presentes no ar atmosférico exterior. Este efeito é notório no período de 26 a 31 de Maio de 2009 mas torna-se mais evidente durante toda a época polínica de 2010.

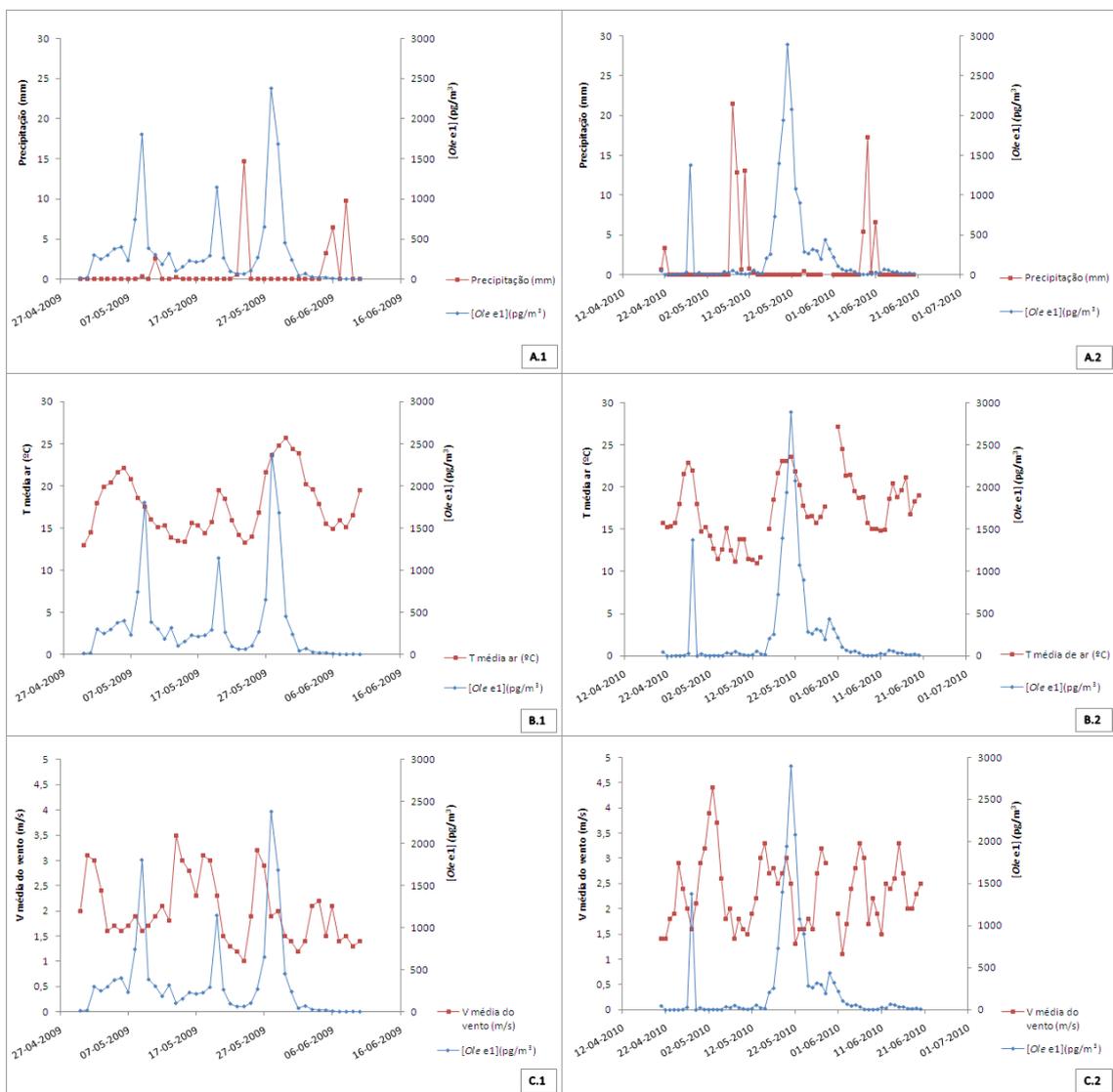


Figura 22: Influência dos parâmetros meteorológicos precipitação (A), temperatura (B) e vento (C) nas concentrações de alergénio nas estações polínicas de 2009 (1) e 2010 (2).

No que diz respeito à velocidade do vento, observa-se que este parâmetro não parece ter um efeito significativo sobre a quantidade de grãos de pólen e a concentração de *O/e* e1. Os dados figura 21 e 22 sugerem que o efeito do vento é mais importante fora do período de polinização principal, onde existe uma correlação entre o aumento da velocidade do vento e o aumento da concentração polínica e de alergénio no ar. Por exemplo, o pico de concentrações polínicas e, sobretudo, de alergénio obtido no final de Maio em 2009 é antecedido pelo aumento da velocidade do vento tal como o início da estação polínica de 2010, e assim a sua acção pode justificar a subida das concentrações de pólen devido muito provavelmente ao transporte a longa distância.

6. Conclusões

Dos resultados obtidos é possível concluir que:

- ✓ O método ELISA *sandwich* mostrou-se bastante sensível e reprodutível na determinação do aeroalergénio *Ole* e1 em amostras de ar colhidas em Évora;
- ✓ As partículas transportadoras de *Ole* e1 ficam maioritariamente retidas no filtro XL pelo que deverão apresentar dimensões superiores a 10 µm;
- ✓ A concentração do aeroalergénio foi directamente proporcional ao conteúdo polínico atmosférico nas duas épocas polínicas analisadas, contudo o conteúdo total de *Ole* e1 por grão de pólen em 2010 foi aproximadamente o dobro do registado em 2009 (2,05 pg e 0,813 pg, respectivamente);
- ✓ As condições meteorológicas influenciaram as concentrações polínicas e de aeroalergénio *Ole* e1 presentes no ar atmosférico, verificando-se que em dias em que os níveis de precipitação foram elevados a concentração polínica e de aeroalergénio diminuíram e que subidas de temperatura correspondem a aumentos na quantidade de grãos de pólen e de *Ole* e1. Por outro o vento não parece ter um efeito significativo nas concentrações de alergénio e de alergénio durante a época polínica, podendo contribuir apenas para fenómenos de transporte a longa distância fora do período de polinização principal.
- ✓ A potência alergénica do pólen em 2010 foi maior que em 2009, pois apesar de ter havido menos pólen, este continha cerca do dobro do alergénio quando comparado com o ano de 2009.

7. Perspectivas Futuras

De modo a avaliar o conteúdo atmosférico em aeroalergénios e consequentemente prevenir o risco de patologias alérgico-respiratórias, surgem ainda alguns estudos que podem completar o trabalho aqui descrito, nomeadamente:

- ✓ Quantificação dos alergénios em amostras de ar exterior durante as épocas polínicas dos próximos anos;
- ✓ Averiguar a existência de correlação entre a quantidade de alergénios e as contagens polínicas obtidas pela metodologia certificada actualmente vigente, assente em tecnologias volumétricas de tipo Hirst, das próximas épocas polínicas;
- ✓ Estudar a influência de variáveis ambientais, como a humidade relativa, temperatura, exposição solar, na produção de alergénio no grão de pólen;
- ✓ Averiguar a potência alérgica dos extractos de pólen utilizando linhas celulares.

8. Bibliografia

A

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S.; 1994; *Cellular and Molecular Immunology*; (2^oed); Effector Mechanisms of immunoglobulin E-Initiated Immune Reactions, 279-279; W.B. SAUNDERS COMPANY;

Abbas, A. K., Lichtman, A. H.; 2005; *Imunología Celular e Molecular* (5^oed); Hipersensibilidad Inmediata, 445-465; ELSEVIER Editora Ltda, Rio de Janeiro;
Abelló; 1980; *Aerobiología: Los Polenos*; Departamento de Alergia, Abelló; Madrid;

Alché, J.D., Castro, A.J., Jiménez-López, J.C., Morales, S., Zafra, A., Hamman-Khalifa, A.M., Rodríguez-García M.I.; 2007; Differential Characteristics of Olive Pollen From Different Cultivars: Biological and Clinical Implications; *Journal of Allergy Clinical Immunology*; 17, 69-75;

Arias, T., Drago, M., Soler, J., Maira, A., Dahl, V., Martínez, A., Hernández, J., Toral, A., Miranda, E., Delgado, L., García-Ortega, P., Clavero, M., Luna, M., González, G., Sánchez, O., Amat, L., Guadaño, E., Vallés, C., Rochel, R., Arroyo, S., Serna, R., Nolla, J., Moncín, M., Garrido-Lestache, J., Santiago, A., Domingo, M.;2002; *Polinosis. Polen y Alergia*. Mra ediciones, S.L., Laboratorios Menarini, S.A.;

Arilla, M. C., Eraso, E., Ibarrola, I., Algorta, J., Martínez, A., Asturias, J., A.; 2002; Monoclonal antibody-based method for measuring olive pollen major allergen Ole e 1; *Ann Allergy Asthma Immunol*; 89, 83-89;

Arilla, M.C., Ibarrola, I., Eraso, E., Martínez, A., Asturias, J.A.; 2002; Inmunoensayo para la cuantificación de Ole e 1 en extractos de pólen; *Alergol Inmunol Clin*; 17, 231-237;

Arshad, S. H., Babu, K. S., Holgate, S. T.; 2001; *Anti-IgE Therapy in Asthma and Allergy* (1^oed); Taylor & Francis e-Library;

Asturias, J. A., Arilla, M. C., Gomez-Bayón, N., Martinez, J., Martinez, A., Palacios, R.; 1997; Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen; *Journal of Allergy Clinical Immunology*; 100, 365-72;

B

Barber, D., Moreno, C., Ledesma, A., Serrano, P., Galán, A., Villalba, M., Guerra, F., Lombardero, M., Rodríguez, R.; 2007; Degree of Olive Pollen Exposure and Sensitization Patterns. Clinical Implications; *J Investig Allergol Clin Immunol*; 17, 63-68;

Barral, P., Suárez, C., Batanero, E., Alfonso, C., Alché, J.D., Rodríguez-García, M. I., Villalba, M., Rivas, G., Rodríguez, R.; 2005; An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination; *Biochemical Journal*; 390, 77–84;

Barral, P., Serrano, Al. G., Batanero, E., Pérez-Gil, J., Villalba, M., Rodríguez, R.; 2006; A recombinant functional variant of the olive pollen allergen Ole e 10 expressed in baculovirus system; *Journal of Biotechnology*; 121, 402–409;

Batanero, E., Barral P., Villalba, M., Rodríguez, R.; 2002; Biodegradable poly (DL-lactide glycolide) microparticles as a vehicle for allergen-specific vaccines: a study performed with *Olea e 1*, the main allergen of olive pollen; *Journal of Immunological Methods*; 259, 87–94;

Behrendt, H., Becker, W.; 2001; Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors; *Current Opinion in Immunology*; 13, 709–715;

Besnard, G., Bervillé, A.; Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms; *Sciences de la vie / Life Sciences*; 323 , 173–181;

Brand, U., Bellinghausen, I., Enk, A. H., Jonuleit, H., Becker, D., Knop, J., Saloga, J.; 1999; Allergen-specific immune deviation from a TH2 to a TH1 response induced by dendritic cells and collagen type I; *Journal of Allergy Clinical Immunology*; 104-5, 1052-1059;

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

C

Caeiro, E.; 2004; Estudo Aeropalinológico Comparativo da Atmosfera de Évora e Portimão; Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal, Universidade de Coimbra; Faculdade de Ciências e Tecnologia de Coimbra, Instituto Botânico, Coimbra, 164;

Carvalho, E., Sindt, C., Verdier, A., Galan, C., O'Donoghue, L., Parks, S., Thibaudon, M.; Performance of the Coriolis air sampler, a high-volume aerosol-collection system for quantification of airborne spores and pollen grains; *Aerobiologia*;

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

Cárdaba, B., Cortegano, I., Florido F., Arrieta, I., Aceituno, E., Pozo, V., Gallardo, S., Rojo, M., Palomino, P., Lahoz, C.; 2000; Genetic restrictions in olive pollen allergy; *J Allergy Clin Immunol*; 105, 292-299

Cárdaba, B., Llanes, E., Chacártegui, M., Sastre, B., López, E., Mollá, R., Pozo, V., Florido, F., Quiralte, J., Palomino, P., Lahoz, C.; 2007; Modulation of Allergic Response by Gene–Environment Interaction: Olive Pollen Allergy; *J Investig Allergol Clin Immunol*; 17, 83-87;

Cariñanos, P., Galan, C., Alcázar, P., Domínguez, E.; 2004; Airborne pollen records response to climatic conditions in arid areas of the Iberian Peninsula; *Environmental and Experimental Botany*; 52 , 11–22;

Cavallotti, A., Regina, T.M.R., Quagliariello, C.; 2003; New sources of cytoplasmic diversity in the Italian population of *Olea europaea* L. as revealed by RFLP analysis of mitochondrial DNA: characterization of the *cox3* locus and possible relationship with cytoplasmic male sterility; *Plant Science*; 164, 241-252;

Chard, T.; 1990; *An introduction to radioimmunoassay and related techniques*; (4^oed); Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford;

Crowther, J. R.; 2009; *The ELISA Guidebook* (2^oed); Humana Press;

D

Díaz de la Guardia, C., ALBA, F., M. M., Trigo, Carmen Galán, Ruíz, L., Sabariego S.; Aerobiological analysis of *Olea europaea* L. pollen in different localities of southern Spain; *Grana*; 42, 234–243;

E

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

F

Finkelman, F. D., Vercelli, D.; 2007; Advances in asthma, allergy mechanisms, and genetics in 2006; *Jornal of Allergy and Cliinal Immunology*; 120-3, 544-540;

Florido, J. F., Delgado, P. G., San Pedro, B. S., Quiralte, J., Arias de Saavedra, J. M., Peralta, V., Valenzuela, L. R.; 1999; High Levels of *Olea europaea* Pollen and Relation with Clinical Findings; *Int Arch Allergy Immunol*; 119, 133-137;

Frew, A. J.; 1996; The immunology of respiratory allergies; *Toxicology Letters*; 86, 65-72;

Fukuda, K., Ohbayashi, M., Morohoshi, K., Zhang, L., Liu, F., Ono, S. J.; 2009; Critical role of IgE-dependent mast cell activation in a murine model of allergic conjunctivitis; *Jornal of Allergy and Cliinal Immunology*; 124, 827-833;

G

Gálán, C., Cariñanos, P., Gracia-Mozo, H., Alcázar, P., Dominguez-Vilches, E.; 2001; Model for forecasting *Olea europaea* L. airborne pollen in South-West Andalusia, Spain; *International Jornal of Biometeorol*; 45, 59-63;

Gálán, C., González, P. C., Teno, P. A., Vilches, E. D.; 2007; *Manual de Calidad y Gestión de la Red Española de Aerobiología (REA)*; Interpretación de los Resultados. Categorías Polínicas. Calidad Biológica del Aire. Difusion de Informacion; 28-31; Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba;

Galán, C., Vázquez, L., García-Mozo, H., Domínguez, E.; 2004; Forecasting olive (*Olea europaea*) crop yield based on pollen emission; *Field Crops Research*; 86, 43–51;

Gaussorgues, R.; 2009; L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. Un risque allergique? The olive tree and its pollen in the Mediterranean basin. An allergy risk?; *Revue française d'allergologie*; 49 , S2–S6;

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

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;

H

Hantusch, B., Schöll, I., Harwanegg, C., Krieger, S., Becker, W., Spitzauer, S., Boltz-Nitulescu, G., Jensen-Jarolim, E.; 2005; Affinity determinations of purified IgE and IgG antibodies against the major pollen allergens Phl p 5a and Bet v 1a: Discrepancy between IgE and IgG binding strength; *Immunology Letters*; 97, 81–89;

Hamilton, R. G.; 2010; Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity; *Jornal of Allergy and Clinical Immunology*; 125-2, 284-296;

Hamman-Khalifa, A. M., Castro, A. J., Jiménez-López, J. C., Rodríguez-García, M. I., Alché, J. D.; 2008; Olive cultivar origin is a major cause of polymorphism for Ole e 1 pollen allergen; *BMC Plant Biology*; 8:10;

Hernández, J. C., Maira, A. B., Delgado, L. F., Rochel, R. P., Martínez, A. C., Toral, A. C.; 2002; *Polinosis: Polen y alergia; Oleáceas: Oleaceae*; mra editores S.L.; Espanha;

Hesse, M., Halbritter, H., Zetter, R., Weber, M., Buchner, R., Frosch-Radivo, A., Ulrich, S.; 2009; *Pollen Terminology: An illustrated handbook; Pollen Morphology*, 15-25; SpringerWienNewYork, Viena;

Holme, D. J., Peck, H.; 1998; *Analytical Biochemistry (3^oed)*; Immunological methods, 227-256; Pearson Education;

Huecas, S., Villalba, M., González, E., Martínez-Ruiz A., Rodríguez, R.; 1999; Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*; *European Journal Biochemistry*; 261, 539-545;

J

Jiang, S., Jasmin, P. X. H., Yun Ting, Y., Ramachandran, S.; 2005; Genome-wide Identification and Molecular Characterization of Ole e I, Allerg 1 and Allerg 2 Domain-containing Pollen-Allergen-like Genes in *Oryza sativa*; *DNA Research*; 12, 167–179;

K

Kaliner, M. A., Lockey, R. F., *Allergens and Allergen Immunotherapy* (4^{ed}); Tree Pollen Allergens, 87-105; Informa, New York e London;

Kambayashi, T., Koretzky, G.A.; 2007; Proximal signaling events in FcεRI-mediated mast cell activation; *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 119, 544-552;

Kemeny, D. M.; 1991; A practical guide of ELISA (1^{ed}); *ELISA Design*, 21-30; Pergamon Press;

Kirmaz, C., Yuksel, H., Bayrak, P., Yilmaz, Ö.; 2005; Symptoms of the olive pollen allergy: Do they really occur only in the pollination season?; *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 15, 140-145;

Kolwalski, W. J.; 2006; *Aerobiological Engineering Handbook; Airborne Pathogens and Allergens*, 15-41; McGraw-Hill Companies;

Kuehn, H. S., Gilfillan, A. M.; 2007; G protein-coupled receptors and the modification of FcεRI-mediated mast cell activation; *Immunology Letters*; 113, 59–69;

L

Law, B.; 2005; *Immunoassay A Practical Guide*; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) development and optimization, 133-156; Taylor & Francis Ltd;

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

Lequin, R. M.; 2005; Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA); *Clinical Chemistry*; 51, 2415–2418;

Linares, C., Nieto-Lugilde, D., Alba, F., Díaz de la Guardia, C., Galán, C., Trigo, M. M.; 2007; Detection of airborne allergen (Ole e 1) in relation to *Olea europaea* pollen in S Spain; *Clinical and Experimental Allergy*, 37, 125–132;

M

Meltzer, E. O.; 2007; Allergic Rhinitis: The Impact of Discordant Perspectives of Patient and Physician on Treatment Decisions; *Clinical Therapeutics*; 29, 1428-1440;

Miescher, S. M., Vogel, M.; 2001; Molecular aspects of allergy; *Molecular Aspects of Medicine*; 23, 413-462;

Miura, K., Orcutt, A.C., Muratova, O. V., Miller, L. H., Saul, A., Long, C. A.; 2007; Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines; *Vaccine*; 26, 193-200;

Moreno-Grau, S., Rendueles, B. E., Moreno, J., Suárez-Cervera, M.; 2007; Polinosis III Polen Y Alergia; Correlación de los recuentos polínicos con la cuantificación de sus alergenos mayores; mra editores S.L.; Espanha;

Moore, P.D., Webb, J.A., Collison, M.E.; 1991; *Pollen Analysis*; (2.ªed); Blackwell Scientific Pub., Oxford;

N

Nakano, N., Nakao, A., Uchida, T., Shirasaka, N., Yoshizumi, H., Okumura, K., Tsuboi, R., Ogawa, H.; 2005; Effects of arachidonic acid analogs on FcεRI-mediated activation of mast cells; *Biochimica et Biophysica Acta*; 1738, 19–28;

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

O

O’Gorman, M. R. G., Donnenberg, A. D.; 2008; *Handbook of Human Immunology* (2ºed); CRC Press, Taylor & Francis Group, New York and London;

Osmekhina, E., Neubauer, A., Klinzing, K., Myllyharju, J., Neubauer, P.; 2010; Sandwich ELISA for quantitative detection of human collagen prolyl 4-hydroxylase; *Microbial Cell Factories*; 9;

P

Paul, W. E.; 2008; Fundamental Immunology (6^oed); Immunologic Mechanisms in Disease, 1376-1425; Lippincott Williams & Wilkins;

Paweska, J. T., Burt, F. J., Swanepoel, R.; 2005; Validation of IgG-sandwich and IgM-capture ELISA for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in humans; *Journal of Virological Methods*; 124 , 173–181;

Portugal Agricola, 1980-2006; Instituto Nacional de estatística;

Q

Quiralte, J., Palacios, L., Rodríguez, R., Cárdbaba, B., Arias de Saavedra, J.M., Villalba, M., Florido, J.F., Lahoz, C.; 2007; Modelling Diseases: The Allergens of *Olea europaea* Pollen; *Jornal of Allergy Clinical Immunology of*; 17, 76-82;

R

Reille, M. ; 1992 ; *Pollen et Spores d'Europe et d'Afrique du Nord* ; Lab. Botanique Historique et Palynologie, Marseille, France;

Ribeiro, H., Oliveira, M., Ribeiro, N., Cruz, A., Ferreira, A., Machado, H., Reis, A., Abreu I.; 2009; Pollen allergenic potential nature of some trees species: A multidisciplinary approach using aerobiological, immunochemical and hospital admissions data; *Environmental Research*; 109, 328–333;

Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Palomares, O., Salamanca, G.; 2007; Emerging pollen allergens; *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 61, 1-7;

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

Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. ; 1996 ; *Immunology* ; (4^oed) ; Antigen Recognition, 7.1-7.13 ; Mosby;

S

Santiago, A. L. V., Vallés, C. P.; 2002; *Polinosis: Polen y alergia; Polinosis*; mra editores S.L.; Espanha;

Serrano, I., Pelliccione, S., Olmedilla A.; 2010; Programmed-cell-death hallmarks in incompatible pollen and papillar stigma cells of *Olea europaea* L. under free pollination; *Plant Cell Reports*; 29, 561–572;

Smith, E. G.; 1984; *Sampling and Identifying Allergenic Pollens amd Molds. An Illustrated Manual for Physicians and Lab. Technicians*; Blewstone Press., San Antonio, Texas;

Smith, E. G.; 1986; *Sampling and Identifying Allergenic Pollens amd Molds. An Illustrated Identification Manual for air samplers. Vol. 2.*, Blewstone Press., San Antonio, Texas;

Shivanna, K. R., Sawhney, V. K.; 1997; *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo;

Sofiev, M., Siljamo. P., Ranta . H., Rantio-Lehtimäki A.; 2006; Towards numerical forecasting of long-range air transport of birch pollen: theoretical considerations and a feasibility study; *International Jornal of Biometeorology*;

Sohi, D. K., Warner J. O.; 2008; Understanding allergy; *Symposium: allergy*; 301-308;

Soler, J. B., Nolla, J. M. R.; 2002; *Polinosis: Polen y alergia; Introducción*; mra editores S.L.; Espanha;

Suárez-Cervera, M., Seoane-Camba, J. A.; 2005; *Polinosis II: Polen e alergia; Biología celular del pólen: origen y función de los alergenos polínicos*; mra editores S.L.; Espanha;

T

Tatemoto, K., Nozaki, Y. Tsuda, R., Konno, S., Tomura, K., Furuno, M., Ogasawara, H., Edamura, K., Takagi, H., Iwamura, H., Noguchi, M., Naito, T.; 2006;

Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 349 , 1322–1328;

Tejera, M., Villalba, M., Batanero, E., Rodríguez, R.; 1999; Identification, isolation, and characterization of Ole e7, a new allergen of olive tree pollen; *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 797-802;

Terral, J. F., Alonso, N., Capdevila, R. B., Chatti, N., Fabre, L., Fiorentino, G., Marinval, P., Jordá, G. P., Pradat, B., Rovira, N., Alibert P.; 2004; Historical biogeography of olive domestication (*Olea europaea* L.) as revealed by geometrical morphometry applied to biological and archaeological material; *Journal of Biogeography* ; 31, 63–77;

Thibaudon, M., Sindt, C.; 2008; Measure of airborne tree pollen allergens (birch, olive); *Revue française d'allergologie et d'immunologie Clinique*; 48, 179–186;

W

Waisel, Y., Mienis, Z., Kosman, E., Geller-Bernstein, C.; 2004; The partial contribution of specific airborne pollen to pollen induced allergy. *Aerobiologia*; 20, 197-208.

Watcharatanyatip, K., Boonmoh, S., Chaichoun, K., Songserm, T., Woratanti, M., Dharakul, T.; 2010; Multispecies detection of antibodies to influenza A viruses by a double-antigen sandwich ELISA; *Journal of Virological Methods*; 163, 238–243;

Wedemeyer, J., Tsai, M., Galli, S. J.; 2000; Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity; *Current Opinion in Immunology*; 12, 624–631;

Weerd, N. A., Bhalla, P. L., Singh, M. B.; 2002; Aeroallergens and pollinosis: Molecular and immunological characteristics of cloned pollen allergens; *Aerobiologia*; 18, 87–106;

Wilson, K., Walker, J.; 2000; *Principles and Techniques of Practical Biochemistry* (5^a ed) Cambridge University Press, Cambridge;

Webgrafia:

www.allergen.org, acedido 26 de Março de 2011;

www.jb.utad.pt, acedido 15 de Junho de 2010;

www.rpaerobiologia.com, acedido 03 de Setembro de 2010;

www.uniprot.org, acedido a 26 de Março de 2011.

9. Anexos

9.1 Tabela ANOVA referente à correlação entre a concentração determinada a partir do filtro XL e M em 2009 (figura 16 B.1).

	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Prob > F
<i>Model</i>	1	24234,06	24234,06	29,70	2,80E-06
<i>Error</i>	40	32634,26	815,86		
Total	41	56868,32			

9.2 Tabela ANOVA referente à correlação entre a concentração determinada a partir do filtro XL e M em 2010 (figura 16 B.2).

	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Prob > F
<i>Model</i>	1	87810,17	87810,17	155,21	0,00
<i>Error</i>	57	32248,41	565,76		
Total	58	120058,59			

9.3 Tabela ANOVA referente à correlação entre as contagens polínicas e a concentração de *Ole e1* obtida no filtro XL em 2009 (figura 19 A.1).

	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Prob > F
<i>Model</i>	1	3,11E+06	3,11E+06	18,86	9,33E-05
<i>Error</i>	40	6,59E+06	164840,76		
Total	41	9,70E+06			

9.4 Tabela ANOVA referente à correlação entre as contagens polínicas e a concentração de *Ole e1* obtida no filtro M em 2009 (figura 19 B.1).

	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Prob > F
<i>Model</i>	1	8147,29	8147,29	6,69	1,35E-02
<i>Error</i>	40	48721,03	1218,03		
Total	41	56868,32			

9.5 Tabela ANOVA referente à correlação entre as contagens polínicas e a concentração total de *Ole e1* obtida em 2009 (figura 19 C.1).

	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Prob > F
<i>Model</i>	1	3,44E+06	3,44E+06	18,842	9,40E-05
<i>Error</i>	40	7,29E+06	182347,82		
Total	41	1,07E+07			

9.6 Tabela ANOVA referente à correlação entre as contagens polínicas e a concentração de *Ole e1* obtida no filtro XL em 2010 (figura 19 A.2).

	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Prob > F
<i>Model</i>	1	1,16E+07	1,16E+07	130,94	1,11E-16
<i>Error</i>	59	5,22E+06	88427,95		
Total	60	1,68E+07			

9.7 Tabela ANOVA referente à correlação entre as contagens polínicas e a concentração de *Ole e1* obtida no filtro M em 2010 (figura 19 B.2).

	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Prob > F
<i>Model</i>	1	106541,12	106541,12	449,26	0,00
<i>Error</i>	57	13517,47	237,15		
Total	58	120058,59			

9.8 Tabela ANOVA referente à correlação entre as contagens polínicas e a concentração total de *Ole e1* obtida em 2010 (figura 19 C.2).

	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Prob > F
<i>Model</i>	1	1,39E+07	1,39E+07	150,92	0,00
<i>Error</i>	59	5,44E+06	92224,12		
Total	60	1,94E+07			