



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Estudo do perfil em alergénios do pólen de *Platanus hybrida* e da sua repercussão na doença alérgica respiratória sazonal na população de Évora

Ana Catarina Galveias Jorge

Orientadora: Prof. Dra. Célia Antunes

Co-orientadora: Prof. Dra. Ana Rodrigues Costa

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2015



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Estudo do perfil em alérgenos do pólen de *Platanus hybrida* e da sua repercussão na doença alérgica respiratória sazonal na população de Évora

Ana Catarina Galveias Jorge

Orientadora: Prof. Dra. Célia Antunes

Co-orientadora: Prof. Dra. Ana Rodrigues Costa

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2015

Este trabalho foi financiado no âmbito do programa Europeu Hialine com o apoio de:



“Lembra-te que podem tirar tudo de ti, menos o teu conhecimento” (Albert Einstein)

Às pessoas bastante importantes na minha vida, pais e avós.

AGRADECIMENTOS

Sendo um espaço limitado para seguramente demonstrar o que estou a sentir neste momento, e que provavelmente não me vai ser possível agradecer como devia a todas as pessoas que ao longo do meu período académico me ajudaram direta ou indiretamente na realização de todos os meus objetivos profissionais e pessoais, acredito que todas as palavras utilizadas estão repletas de um profundo e mais sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus pais e avós por todo o apoio solicitado nesta grande etapa da minha vida e que sem eles todo este caminho académico não seria possível. Do fundo do coração um MUITO OBRIGADA por proporcionarem um futuro melhor, por contribuírem para uma melhor educação, por acreditarem sempre em mim e por todos os ensinamentos de vida proporcionados. Sempre vos deverei isto mas nunca me vou esquecer do quanto fizeram por mim.

Queria agradecer também à minha orientadora, Prof. Dra. Célia Antunes e co-orientadora Prof. Dra. Ana Rodrigues Costa, pela oportunidade, por todo o conhecimento passado e por todo o apoio que me prestaram para a realização de todo este trabalho. Foi um privilégio tê-las como professoras que muito contribuíram para o meu enriquecimento e formação académica. Foram imprescindíveis na realização desta nova etapa da minha vida. MUITO OBRIGADA.

Ao meu namorado por ser imprescindível e por “aturar” todo o meu “mau humor” quando isto não caminhava pelo sítio correto.

À minha colega de laboratório Inês Ramos pelo trabalho em equipa desenvolvido, pelas maluquices que advinham do cansaço, pelo conhecimento que partilhamos e pela inter-ajuda.

Por fim, e não menos importante, a todos os meus amigos que sempre me apoiaram e me diziam “tem calma” e “tu vais conseguir” das vezes que mais precisava.

A todos os intervenientes, mais uma vez, MUITO OBRIGADA!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS E CONVENÇÕES	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO	1
1.1 A polinose e perspectiva histórica	1
1.2 Prevalência da polinose.....	1
1.3 Os pólenes: características estruturais e morfológicas.....	2
1.4 Os pólenes alergizantes.....	3
1.4.1 Fatores que influenciam a distribuição dos pólenes.....	4
1.4.2 Prevalência dos pólenes alergizantes.....	4
1.4.3 <i>Platanus Hybrida</i> : Caraterização física e taxonómica com distribuição por Portugal continental	6
1.4.4 O pólen de Plátano e seus alergénios	7
1.5 ALERGIA A PÓLENES – HIPERSENSIBILIDADE TIPO I	8
1.5.2 Mecanismos de resposta alérgica	11
1.5.3 Os Anticorpos ou imunoglobulinas: estrutura e funções.....	14
1.5.4 Reconhecimento antigénio-anticorpo e reação cruzada	16
1.6 METODOLOGIAS UTILIZADAS NO ESTUDO DA SENSIBILIZAÇÃO E DOS DOS PERFIS ALERGOLÓGICOS	18
1.6.1 Testes cutâneos por picada ou “PRICK”	18
1.6.2 Quantificação de IgE por “ELISA SANDWICHE” (PRIST – Paper Radio Immuno Sorbent Test).....	18
1.6.3. RAST (<i>radioallergosorbent test</i>) para determinação de IgE - específica.....	19
1.6.4 Immunocap ISAC	19
1.6.5 Immunoblot.....	19
2. OBJECTIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral	21
2.1.1 Objetivos específicos.....	21
3. PROBLEMÁTICA	22
4. METODOLOGIA.....	22
4.1 Procedimento experimental	22
4.1.1 Colheita do pólen	22
4.1.2 Extração do conteúdo proteico polínico	22

4.1.3	Quantificação da proteína total – Método de Bradford	23
4.1.4	Estudo do perfil proteico polínico por eletroforese de focalização isoelétrica	23
4.1.5	Estudo do perfil proteico polínico por eletroforese de gel policrilamida SDS-PAGE27	
4.1.6	DETERMINAÇÃO DO PERFIL ALERGOLÓGICO DO PÓLEN DE <i>PLATANUS HYBRIDA</i> E <i>DACTYLIS GLOMERATA</i>	29
4.2	MATERIAL E EQUIPAMENTO	34
4.3	REAGENTES.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Biodistribuição de <i>Platanus hybrida</i> na Cidade de Évora	36
5.2	Determinação do perfil proteico de um extrato solúvel de pólen de <i>P.hybrida</i>	38
5.2.1	Determinação do perfil proteico de acordo com o ponto isoelétrico - IEF.....	38
5.2.2	Determinação do perfil proteico de acordo com a massa molecular – SDS-PAGE	40
5.3	ESTUDO DO PERFIL ALERGOLÓGICO AO PÓLEN DE <i>PLATANUS HYBRIDA</i>	42
5.3.1	Estudo da sensibilização ao pólen de <i>Platanus hybrida</i>	42
5.4	ESTUDO DO PERFIL EM ALERGÉNIOS AO PÓLEN.....	45
6	CONCLUSÕES.....	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - GRÃOS DE PÓLEN DE 4 ESPÉCIES DIFERENTES: A) <i>OLEO EUROPAE</i> ; B) <i>QUERCUS ROTUNDIFOLIA</i> ; C) <i>DACTYLIS GLOMERATA</i> ; D) <i>PLATANUS HYBRIDA</i> [1]	3
FIGURA 2 - IMPACTO DO EFEITO DA ILHA DE CALOR URBANA NO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE ALERGÉNIO (JIANAN ET AL, 2007).....	4
FIGURA 3- DISTRIBUIÇÃO DE ALGUNS PÓLENES ALERGIZANTES.....	5
FIGURA 4 – (A) REPRESENTAÇÃO DE <i>PLATANUS HYBRIDA</i> ; (B) CARATERIZAÇÃO TAXONÓMICA (C)DISTRIBUIÇÃO POR PORTUGAL CONTINENTAL	6
FIGURA 5 – PÓLEN DE <i>PLATANUS HYBRIDA</i> . IMAGEM DE MICROSCOPIA DE VARRIMENTO DO CONTEÚDO POLÍNICO	7
FIGURA 6 – SEQUÊNCIA DE MECANISMOS DA FASE DE SENSIBILIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIZADE TIPO I	12
FIGURA 7 – SEQUÊNCIA DE MECANISMOS DA FASE EFETORA DE UMA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIZADE TIPO I.....	13
FIGURA 8 – ESQUEMA DA MOLÉCULA DE ANTICORPO	15
FIGURA 9 – MECANISMO DE REATIVIDADE CRUZADA. REPRESENTAÇÃO DOS DIFERENTES ANTIGÉNIOS (AgA, AgB E AgC).....	16
FIGURA 10 – CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA ATRAVÉS DO MÉTODO DE BRADFORD, UTILIZANDO PADRÕES DE BSA.	23
FIGURA 11 - EQUIPAMENTO DE LUZ FOTO POLIMERIZADORA.....	24
FIGURA 12 - EQUIPAMENTO DE CORRIDA ELETROFORÉTICA DE FOCAGEM ISOELÉTRICA.....	25
FIGURA 13 – GEL-DOC SYSTEM E SOFTWARE	26
FIGURA 14 – SUPORTE DO APARELHO DE CORRIDA ELETROFORÉTICA SDS-PAGE.....	28
FIGURA 15 – EXEMPLO DO ESQUEMA DA MICRO PLACA UTILIZADA PARA DETEÇÃO IMUNOLÓGICA NA SENSIBILIZAÇÃO AO PÓLEN.....	30
FIGURA 16 – (A) CONSTITUIÇÃO DE “SANDWICHE” PARA TRANSFERÊNCIA ELETROFORÉTICA; (B) EQUIPAMENTO DE TRANSFERÊNCIA ELETROFORÉTICA	32
FIGURA 17 – MEMBRANA APÓS TRANSFERÊNCIA ELETROFORÉTICA CORADA COM SOLUÇÃO PONCEAU S.....	33
FIGURA 18 – IMAGENS AÉREAS DE DIVERSOS LOCAIS DA CIDADE DE ÉVORA ONDE SE ENCONTRAM OS PLÁTANOS.	37
FIGURA 19 – BIODISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>PLATANUS HYBRIDA</i> NAS ZONAS DE MAIOR ABUNDÂNCIA NA CIDADE DE ÉVORA	39
FIGURA 20 – ELETROFORETOGRAMAS OBTIDOS APÓS SEPARAÇÃO POR IEF EM GÉIS DE POLICRILAMIDA (A E B) DOS EXTRATOS DE <i>PLATANUS HYBRIDA</i> E <i>DACTYLIS GLOMERATA</i>	40

FIGURA 21 – PERFIL PROTEICO DO EXTRATO DE <i>PLATANUS HYBRIDA</i> E <i>DACTYLIS GLOMERATA</i> EM UM GEL, REPRESENTATIVO DE UM TOTAL DE 3 GÉIS REALIZADOS.....	42
FIGURA 22 –IMUNOREATIVIDADE DE CADA UM DOS SOROS NA PRESENÇA DE EXTRATO DE <i>P.HYBRIDA</i> (N=2) E <i>D.GLOMERATA</i> (N=1)	44
FIGURA 23 – REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO IMUNOLÓGICA ENTRE OS SOROS NÃO INIBIDOS (NI) E INIBIDOS (I) COM EXTRATO DE <i>DACTYLIS GLOMERATA</i>	45
FIGURA 24 –REPRESENTAÇÃO DE MEMBRANAS DE PVDF COM IMUNOREATIVIDADE A PROTEÍNAS DE <i>PLATANUS HYBRIDA</i> E <i>DACTYLIS GLOMERATA</i> APÓS SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA POR SDS-PAGE.....	47
FIGURA 25 – IMMUNOBLOT DO EXTRATO DE <i>P.HYBRIDA</i> APÓS SEPARAÇÃO POR FOCAGEM ISOELÉTRICA.....	48

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – ALERGÉNIOS MAIS RELEVANTES DE <i>PLATANUS HYBRIDA</i> E CORRESPONDENTES CARATERISTICAS	8
TABELA 2 – FUNÇÕES ESPECIFICAS DAS CÉLULAS ENVOLVIDAS NUMA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TIPOI	10
TABELA 3 –MEDIADORES QUIMICOS ENVOLVIDOS NUMA REAÇÃO ALÉRGICA	11
TABELA 4 – PROPRIEDADE DAS IMUNOGLOBULINAS	15
TABELA 5 – VALORES DE pI DO PADRÃO DA BIO-RAD REFERENTE À ELETROFORESE DE FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA	26
TABELA 6 – VALORES DOS PONTOS ISOELÉTRICOS CALCULADOS PARA AS BANDAS PROTÉICAS DETETADAS NA SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA POR IEF PARA OS EXTRATOS DE <i>PLATANUS HYBRIDA</i> (N=3) E <i>DACTYLIS GLOMERATA</i> (N=3).....	40
TABELA 7 – VALORES DE MASSAS MOLECULARES CALCULADOS PARA AS BANDAS PROTEICAS DOS EXTRATOS DE <i>PLATANUS HYBRIDA</i> (N=3) E <i>DACTYLIS GLOMERATA</i> (N=5) APÓS SEPARAÇÃO PROTEICA POR SDS-PAGE.....	42
TABELA 8 – RESUMO DOS RESULTADOS DE REATIVIDADE CRUZADA, OBTIDOS PARA OS SEIS SOROS TESTADOS, ENTRE <i>PLATANUS HYBRIDA</i> E <i>DACTYLIS GLOMERATA</i>	45
TABELA 9 - PERFIL ALERGOLÓGICO DE EXTRATO DE <i>PLATANUS HYBRIDA</i> E <i>DACTYLIS GLOMERATA</i> QUANTO À MM.	47
TABELA 10 – PERFIL ALERGOLÓGICO CORRESPONDENTE AO EXTRATO DE <i>PLATANUS HYBRIDA</i> REFERENTE AO pI.....	48

ABREVIATURAS E CONVENÇÕES

TLP: Proteína semelhante à Taumatina (do inglês “Taumatin Like Protein”)

LPT: Proteína de transferência de lípidos (do inglês “Lipid Transfer Protein”)

IgA: Imunoglobulina A

IgM: Imunoglobulina M

IgG: Imunoglobulina G

IgE: Imunoglobulina E

IgD: Imunoglobulina D

Fc: Fração constante

Fc ϵ RII: Recetor de IgE (fração constante Fc) de baixa afinidade

Fc ϵ RI: recetor de IgE (fração constante Fc) de alta afinidade

IEF: Focalização isoeétrica (do inglês “Isoelectric focusing”)

TBS-T: Tampão de lavagem Solução salina temporada com Tris e com Twin, (do inglês “Tris-Bufferd Saline witer Tween”)

TEMED: Tetrametiletilenodiamina

BSA: Albumina de soro de bovino (do inglês “Bovine Serum Albumin”)

Kd: Constante de dissociação

pI: Ponto isoeétrico

CDR: Determinante de complementaridade (do inglês “ Complementarity determinant”)

CD40: Determinante de complementariedade 40 (do inglês Cluster of differentiation no. 40)

DC: Células dendríticas (do inglês “Dendritic cells”)

APC: Células apresentadoras de antigénios (do inglês “antigen presentation cells”)

APS: Persulfato de amónio (do inglês “Ammonium Persulfate”)

PVDF: Difluoreto de polivinilidene (do inglês “ Polivinilde fluoride”)

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês “ Sodium doderyl sulfhate”)

FMN: Riboflavina (do inglês “Flanne mono”)

DTT: Ditiotreitól

RESUMO

Estudo do perfil em Alergénios do pólen de *Platanus hybrida* e da sua repercussão na doença alérgica respiratória sazonal na população de Évora

O plátano (*Platanus hybrida*), uma árvore ornamental e de sombra, produz pólen em grande quantidade, sendo responsável pela exposição elevada a pólen no início da primavera. Desconhece-se, porém, o seu perfil alergénico. Este trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil em alergénios do pólen de plátano em Évora, Alentejo. Obtiveram-se extratos de pólen que foram liofilizados e conservados a -80°C. O perfil em alergénios foi avaliado por western blot utilizando soros humanos (obtidos mediante consentimento informado de doentes do Hospital do Espírito Santo de Évora – HESE). Identificaram-se diversas bandas imunorreativas de pólen de *P. hybrida*, sugerindo a presença de alergénios.

Evidenciou-se também a existência de reatividade cruzada com pólen de gramíneas. Estes resultados sugerem que o pólen de plátano, dada a sua grande abundância na cidade de Évora, poderá contribuir para o agravamento a sintomatologia da população que sofre de polinose, em particular no início da primavera.

ABSTRACT

Study on the pollen allergen profile from *Platanus hybrida* and its contribution to pollinosis in the population of Évora

Plane trees, hence pollen, are highly abundant in the city of Évora, nonetheless allergen profile has not yet been evaluated. The aim of this work was to characterize the allergen profile of pollen from *Platanus hybrida*, one of the most representative species in Évora showing pollination prior to the main pollen season in Alentejo. Pollen extracts were lyophilized and stored at -80°C until analysis. Protein content was determined by the Bradford method. SDS-PAGE followed by western blot, using allergic patient sera (obtained from the Hospital do Espírito Santo de Évora – HESE), were performed. Western blot have shown several immunoreactive bands.

Cross-reactivity of *P. hybrida* with *Q. rotundifolia* and *D. glomerata* was found. These results evidenced allergens found in *P. hybrida* pollen. Moreover, cross-reactivity between *P. hybrida* and highly allergenic species such as *D. glomerata* was found which probably contributes for the aggravation of pollinosis in the early spring.

INTRODUÇÃO

1.1 A polinose e perspectiva histórica

Os grãos de pólen são atualmente referenciados em todo o mundo como potenciais fontes de alergénios e os principais causadores de polinose (doença do tipo alérgico). Este tipo de doença é bastante comum e embora apresente alta incidência na população, havia muito poucas referências sobre este tema antes do século XIX. Nas últimas décadas do século XIX, Dr. Bostock desenvolveu estudos que revelaram que as plantas induziam o aparecimento da “febre dos fenos”. Esta primeira definição foi proposta por este investigador em 1819 num trabalho apresentado na Sociedade Médico-cirúrgica de Londres onde o autor descreveu a sua própria doença, que se manifestava apenas em certas estações do ano.

Blackel no ano de 1995, confirmou a teoria do Dr. Bostock e acrescentou que o que provocava este tipo de patologia era o pólen, chegando a esta conclusão devido à realização de testes de picada cutânea (“skin Prick test”). Esta descoberta contribuiu para consolidar a probabilidade da existência de uma relação entre os grãos de pólen e a então designada “febre do feno”, dando origem à atual designação de polinose, proposta por Jianan (Jianan et al, 2007; assunto revisto por Valero & Picado, 2002).

Desde então e até ao momento, este tema tem sofrido bastantes progressos (Jianan et al, 2007). Atualmente sabe-se que os grãos de pólen possuem proteínas solúveis em água que os tornam prontamente disponíveis e eficazes para ocasionar um tipo de reação, uma vez que entram automaticamente em contacto com as mucosas do sistema respiratório. Nesta parte do sistema respiratório, devido ao seu meio ser isotónico, os alergénios difundem facilmente e contactam com elementos do sistema imunitário, podendo provocar o desenvolvimento de reações de hipersensibilidade tipo I (Rocha- Estrada et al, 2004).

1.2 Prevalência da polinose

O sistema respiratório entra em contacto com os grãos de pólen por inalação. Devido a esta exposição, existe uma enorme probabilidade da ocorrência de reações de hipersensibilidade em indivíduos suscetíveis geneticamente, imediata ou não, o que pode conduzir ao desenvolvimento dos vários sintomas caraterísticos (Rocha- Estrada e tal, 2004).

Estima-se que 2- 10% da população mundial sofre de polinose. Nos EUA e na Europa a prevalência de polinose tem vindo a aumentar nas últimas décadas e estima-se que possa

atingir os 35% da população nos anos vindouros. Na China 0,5%-5% da população apresenta reatividade ao pólen (Jianan et al, 2007).

Diversos estudos clínicos efetuados em cidades espanholas, demonstraram também que umas das principais causas de alergia são os polénes. Observaram que em Madrid, a prevalência de testes cutâneos positivos foi de 52%-56%. Consequentemente na Galiza (noroeste de Espanha) a sensibilização em indivíduos estava compreendida entre 8%-9% e na cidade de Córdoba (sudeste de Espanha) foi estimada 17%. Nesta região, os tipos polínicos mais relevantes são as gramíneas e a oliveira. Contudo, outros têm vindo a ser considerados. Uma percentagem significativa das alergias parece ser derivada do pólen de plátano (*Platanus hybrida*), bastante comum nas cidades espanholas (Mozo et al, 2011). Em Portugal o fenómeno é semelhante, apresentando-se a sensibilização a gramíneas em primeiro lugar seguida da oliveira (Caeiro et al, 2013). O plátano é também uma planta abundante nas cidades portuguesas, contudo, é pouco conhecida a sensibilização a este tipo polínico, havendo um estudo com 27 pacientes de Évora que refere sensibilização a plátano em 10,7% dos indivíduos (Galan et al, 2005). São também insuficientes os estudos do perfil alergológico desta espécie polínica.

1.3 Os pólenes: características estruturais e morfológicas

O grão de pólen é uma estrutura microscópica que produz gâmetas masculinos para gimnospérmicas e angiospérmicas e os transfere para a parte feminina. Apresenta uma característica estrutural bastante importante, as suas paredes externas são revestidas por uma parede resistente, a exina, uma parede interna mais frágil a intina, uma célula germinativa e uma célula vegetativa. A exina é composta por carotenóides, lípidos e lipoproteínas, tendo como função a definição das posições de abertura para a germinação, ou seja, ligação entre o pólen e o agente polinizador e especificação entre as interações do pólen com o estigma. Estas aberturas mostram grande variedade morfológica, podendo apresentar-se como sulcos alongados, poros circulares ou a combinação dos dois, e constituindo uma forma típica da estrutura dos grãos de pólen (Brandão, 2013). Estes aspetos, abertura, posição e ornamentação da exina e o tamanho do grão de pólen são características taxonómicas importantes para o reconhecimento dos diferentes tipos polínicos. No que diz respeito à ornamentação da exina, esta varia de acordo com o tipo de polinização da planta, ou seja, plantas que apresentem uma polinização anemófila (através do vento) apresentam saliências

na estrutura da exina, e plantas que possuam polinização entomófila (através de insetos) a estrutura da exina é totalmente lisa (Figura 1) (Brandão, 2013).

Para possível classificação, os grãos de pólen têm que ser observados, a fim de se determinar as mais diversas características que lhe conferem a identificação, como é o caso da forma, morfologia, tamanho, número de poros, número de sulcos e por fim a ornamentação do corpo central (Brandão, 2013).

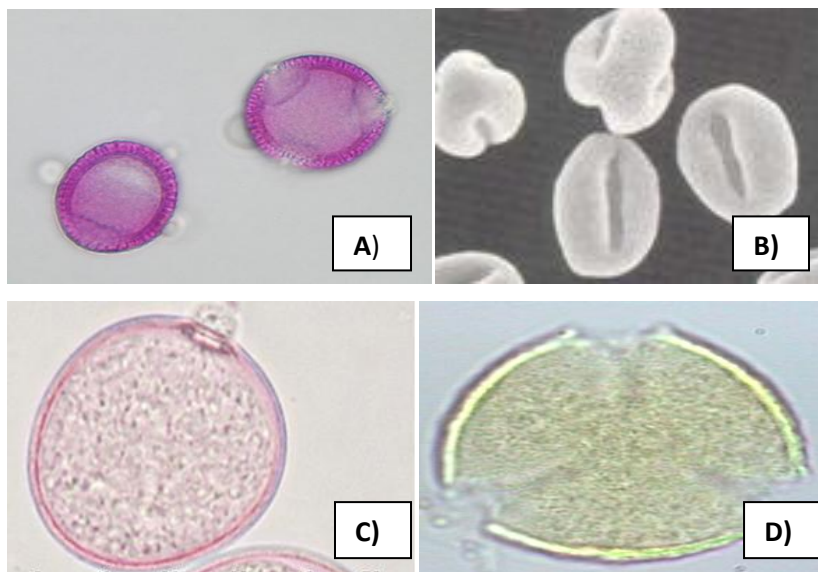


Figura 1: Grão de pólen de 4 espécies diferentes: A) *Oleo europae*; B) *Platanus hybrida* ; C) *Dactylis glomerata* ; D) *Quercus rotundifolia*. ([1] & Brandão, 2013)

1.4 Os pólenes alergizantes

Os alergénios são maioritariamente glicoproteínas ou lipoproteínas que derivam de fontes biológicas e que reagem com componentes do sistema imunitário provocando uma reação alérgica. Embora se desconheça o que torna determinados tipos polínicos alergizantes em detrimento de outros, é sabido que a reação alérgica depende da exposição aos alergénios (Caeiro et al, 2013). Normalmente casos graves de polinose ocorrem quando existem elevadas concentrações de grãos de pólen no ar por m³ e a sua distribuição é um fator determinante na doença alérgica respiratória (Jianan et al, 2007).

1.4.1 Fatores que influenciam a distribuição dos pólenes

A distribuição e libertação do pólen depende da meteorologia, ou seja, condições meteorológicas variáveis influenciam a presença deste tipo polínico na atmosfera. A temperatura é o fator que influencia bastante as concentrações presentes no ar (Fernandez-González e tal, 2010).

Atualmente, o aumento das construções de espaços verdes inadequados e de condições climáticas extremas, nomeadamente, ondas de calor que se fazem sentir, e a poluição atmosférica das cidades, entre outros fatores potenciais contribuem para a agregação dos grãos de pólen aos espaços urbanos e portanto, aumento da exposição ao pólen (Figura 2) (Jianan et al, 2007).

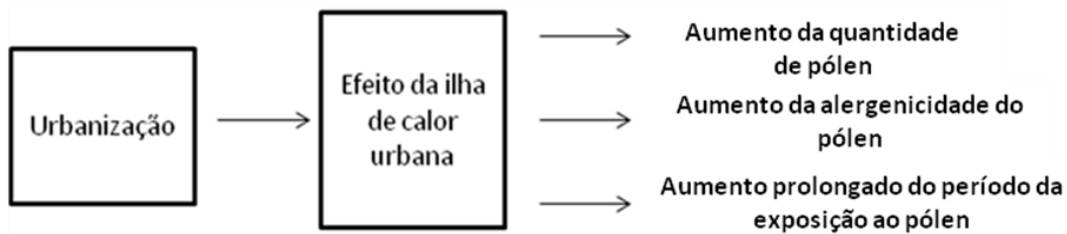


Figura 2: Impacto do efeito da ilha de calor urbana no aumento da concentração de alergénio (adaptado de Jianan et al, 2007).

1.4.2 Prevalência dos pólenes alergizantes

A prevalência dos pólenes alergizantes é um fator importante para o estudo da sensibilização aos pólenes.

Na Europa, como representado na figura 3A, as espécies mais predominantes são a bétula, as gramíneas e a oliveira, destacando o facto de as gramíneas estarem presentes em toda a Europa do Norte, Centro e Sul. Estas espécies apresentam um enorme relevo do ponto de vista alergénico, pois são consideradas os 3 principais grupos de espécies que de alguma forma poderão provocar sensibilização. A ambrósia sendo considerada uma espécie invasiva, não se encontra representada no mapa mas apresenta uma elevada abundância (dados não publicados do projeto Europeu Hialine).

Em Portugal (figura 3B) destaca-se o facto de em todo o território português as gramíneas e oliveira se encontrarem em primeiro lugar, dando mais relevo na zona sul interior, Évora, em que a azinheira e o sobreiro (*Quercus*) apresentam uma maior abundância na cidade, cerca de 40%, seguindo-se as gramíneas com aproximadamente 25%. O plátano também se encontra presente em todo o território mas com uma maior abundância na zona do Alentejo (10%) (Caeiro et al, 2007).

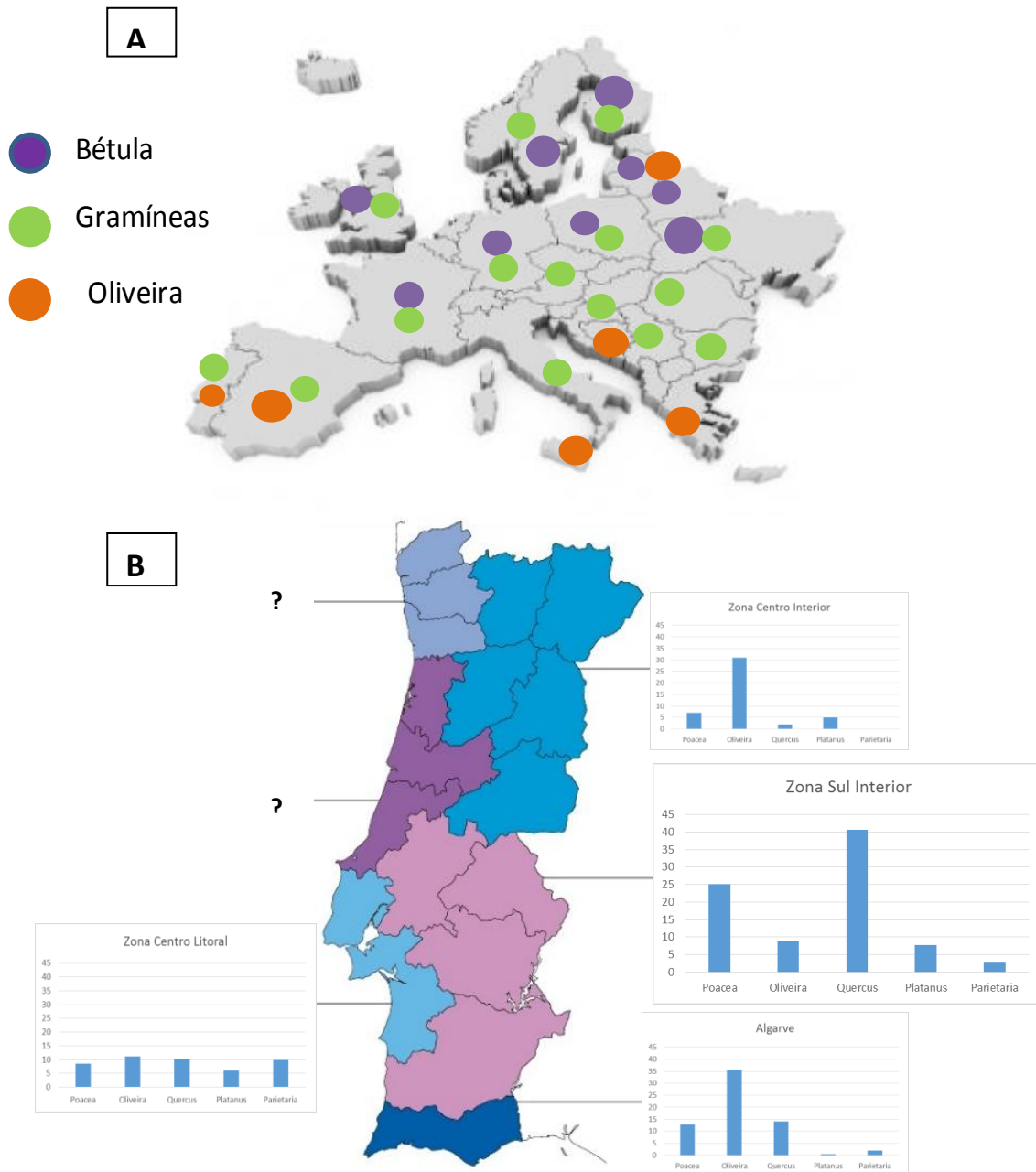


Figura 3: Distribuição de alguns pólenes alergizantes na Europa (A) e em Portugal (B). (dados não publicados do projeto Europeu Hialine; Caeiro et al, 2007).

Neste território encontra-se distribuído pelas cidades litorais do Norte e Centro (Figura 4C). Na cidade de Évora, embora a planta exista não se encontra identificada no mapa da figura 4 e a sua distribuição não esta caraterizada.

1.4.4 O pólen de Plátano e seus alergénios

Podem ser encontradas grandes concentrações deste tipo polínico em diversos países mas apenas é bastante significativo em Espanha, Portugal, Inglaterra, França, Suíça, Bélgica e Itália (J. Subiza et al, 1994). Durante a época de polinização são libertados grandes quantidades de amentilhos e influorecências, aumentando bruscamente de zero grãos de pólen por m³ de ar a várias centenas.

O pólen de *Platanus hybrida* (Figura 5) é do tipo trizonocolpado, apresentando uma forma circular e elíptica com diâmetro que varia de 16-18 µm e aberturas simples, possuindo colpos largos e difusos com uma membrana igualmente difusa (Caeiro, 2004).

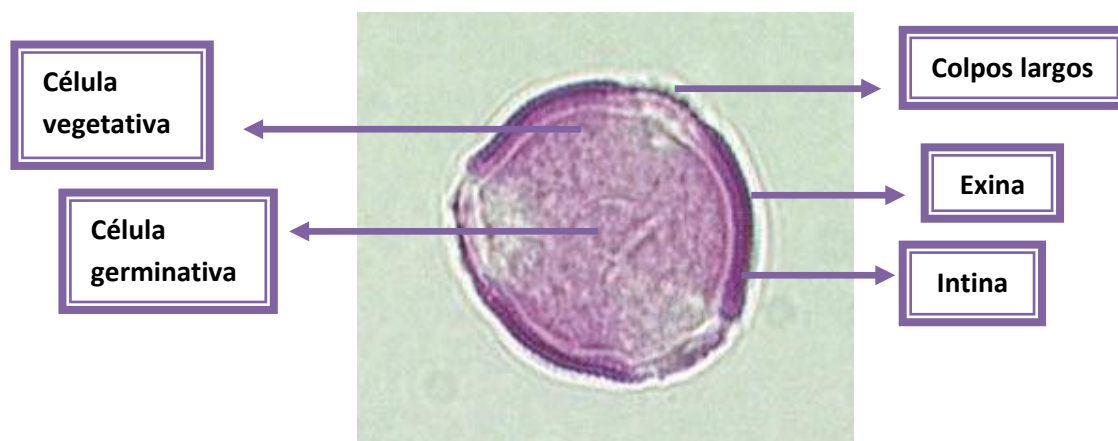


Figura 5: Pólen de *Platanus hybrida*. Imagem de microscopia de varrimento do conteúdo polínico. (adaptado de J. Subiza et al, 1994)

Os alergénios do pólen de plátano estão classificados de Pla a 1 a Pla a 8 (ver tabela 1) [1]. De acordo com os dados atuais, apenas duas proteínas alergénicas foram já associadas a polinose, a *Pla a 1* e a *Pla a 2* [1].

A *Pla a 1* é considerada como alergénio “major” e também o principal da espécie *Platanus* (Fernández-González et al, 2013). É uma proteína não glicosilada com 18 kDa de massa molecular e apresenta como função ser inibidora da invertase [1]. Microscopicamente é detetada no retículo endoplasmático das células dos grãos de pólen, sendo a sua função a de intervir na germinação do grão de pólen e na formação do tubo polínico (Suárez-Cervera et, al 2005).

Tabela 1: Alergénios mais relevantes de *Platanus hybrida* e correspondentes características [1]

Alergénios	Tipo de proteína	Massa Molecular (MW)	Vias de exposição	Outras designações
<i>Pla a 1</i>	Inibidor da invertase	18 MW	Inalação	a3425 / inibidor da invertase
<i>Pla a 2</i>	Poligalacturonase	43 MW	Inalação	a573 / proteínas com CCDs (XF) ¹ / poligalacturonase
<i>Pla a 3</i>	LTP ²	10 MW	Inalação	9k-LTP
<i>Pla a 8</i>	Profilina	15 MW	Inalação	Profilina
<i>Pla TLP</i>	TLP ³	25 MW	Inalação	Taumatina, TLP

(1) – Proteínas com determinantes de reação cruzada com glúcidos (CCD, do inglês “*cross-reactive carbohydrate determinants*”)

(2) – LTP - Proteína de transferência de lípidos

(3) – TLP – Proteína semelhante à taumatina

Por outro lado, a *Pla a 2* é uma glicoproteína com peso molecular de 43 kDa e ponto isoelétrico de 9.3. É uma poligalacturonase muito abundante em plantas angiospérmicas (Ibarrola et al, 2004). Tem sido considerada uma causa da elevada percentagem de sensibilização ao pólen de *Platanus* pois possui uma elevada homologia com glicoproteínas de tipos polínicos não relacionados, como por exemplo, *Bet v 2 (Betula)*, *Phl p 7 (Phleum)* e *Par j 1 (Parietaria)* (Asturias et al, 2003; Amoresano et al, 2003; Arilla et al, 2006).

Não é ainda claro o nível de sensibilização da população a alergénios de plátano. Na bibliografia os valores indicados para indivíduos sensibilizados ao pólen de plátano, variam entre 87% e 83% para *Pla a 1* e para *Pla a 2* respetivamente (Asturias et al, 2002).

1.5 ALERGIA A PÓLENES – HIPERSENSIBILIDADE TIPO I

As reações de Hipersensibilidade do tipo I, também designadas reações de hipersensibilidade imediata, são causadas pela libertação de mediadores químicos dos

mastócitos, e relacionados com a produção de IgE contra antígenos e posterior ligação destas aos mastócitos em diversos tecidos. É caracterizada por ser uma reação rápida que origina vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e contração do músculo brônquico e visceral, seguindo-se uma reação inflamatória que ocorre em indivíduos expostos mais do que uma vez ao antígeno. São também designadas atopias, e os indivíduos suscetíveis são designados atópicos. São diversos os tipos celulares e os mediadores químicos envolvidos numa resposta alérgica.

1.5.1 Células e mediadores químicos envolvidos numa reação de hipersensibilidade tipo I

1.5.1.1 Células

Existem diversos tipos celulares envolvidos no desenvolvimento das reações de hipersensibilidade tipo I, com funções diferenciadas (Tabela 3).

Numa primeira exposição ao alérgeno, as células responsáveis pela apresentação do antígeno são as células dendríticas (DC) apresentando como função a captação, processamento do antígeno e a apresentação de células T que se diferenciam em células “T-helper”, segregando maioritariamente 4 tipos de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13) (Abbas et al, 2005).

Em consequência do aumento de células Th₂ e segregação das interleucinas IL-4 e IL-13 por parte destas, é promovida a divisão das células B e estimulada a sua diferenciação em células B específicas produtoras de IgE. As células B apresentam como função generalizada neutralizar e detetar qualquer tipo de substâncias ao organismo (Abbas et al, 2005).

Os mastócitos e basófilos, aquando da sua ativação, libertam mediadores químicos associados às reações do tipo alérgico (ver tabela 2).

Tabela 2: Funções específicas das células envolvidas numa reação de hipersensibilidade tipo I (adaptado de Abbas et al, 2005 & Kindt et al, 2006).

Componente celular	Sub-populações	Função	Origem	Observações
Células dendríticas	-	Ativar a produção de células T para se diferenciarem em células "T-helper".	-	Localizadas nas mucosas
Linfócitos T	Th ₂	Segregam 4 tipos de citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13. Ativação dos eosinófilos através da segregação da citocina IL-5.	-	Localizados no sangue com uma concentração de aproximadamente 20%.
Linfócitos B	-	Secreção de moléculas de anticorpo	-	Localizados no sangue com uma concentração de aproximadamente 10%.
Basófilos	-	Libertar substâncias farmacologicamente ativas dos seus grânulos citoplasmáticos que desempenham um papel bastante importante numa reação do tipo alérgico.	Medula óssea, sofrendo um processo de amadurecimento e libertados no sangue.	Localizados no sangue com uma concentração de aproximadamente 1%.
Mastócitos	-	Libertação de mediadores químicos associados a uma reação alérgica.	Células progenitoras da medula óssea.	Localizados no sangue com uma concentração de aproximadamente 1-10%.

1.5.1.2 Mediadores químicos

São diversos, e com diferentes funções, os mediadores químicos segregados pelas diferentes populações de células do sistema imunitário.

Os principais mediadores químicos envolvidos numa reação alérgica são as citocinas, as aminas vasoativas, as proteases e mediadores lipídicos. Estes mediadores apresentam funções distintas. As citocinas dividem-se em vários tipos e cada um deles apresentam funções específicas numa reação do tipo alérgico (Tabela 3). A IL-4 e IL-13 são citocinas, segregadas pelas células Th₂, que estimulam as células B a diferenciarem-se em células B específicas produtoras de IgE específica para aquele antígeno, enquanto que a IL-5 ativa os eosinófilos. São ambas segregadas pelas células Th₂ (ver tabela 3) (Abbas et al, 2005).

A histamina é uma das aminas vasoativas formada pela descarboxilação do aminoácido, histidina, e é considerado o maior componente dos grânulos dos mastócitos. Tem

como função causar a dilatação de pequenos vasos sanguíneos, aumentar a permeabilidade vascular e estimular a contração temporária do músculo liso (ver tabela 3) (Abbas et al, 2005 & Kindt et al, 2004).

As proteases, como é o caso da triptase, para além de poderem causar lesões nos tecidos locais, também são responsáveis pela remodelação do tecido (ver tabela 3).

Os mediadores lipídicos regulam a resposta imunitária atuando como adjuvantes, e recrutam células efetoras (ver tabela 3) (Abbas et al, 2005).

Tabela 3: Mediadores químicos envolvidos numa reação alérgica (adaptado de Abbas et al, 2005).

Mediadores químicos	Exemplos	Funções
Citocinas	IL-4	Estimulam os linfócitos B específicos para o antigénio a transformar-se em células produtoras de IgE.
	IL-5	Ativação dos eosinófilos.
	IL-13	Estimulam os linfócitos B específicos para o antigénio a diferenciarem-se em células produtoras de IgE; Estimulam as células epiteliais das vias respiratórias para a produção de muco e desenvolvimento de outros sintomas associados.
Proteases	Triptase	Danificação dos tecidos e remodelação do tecido.
Aminas vasoativas	Histamina	Causa a dilatação de pequenos vasos sanguíneos; Aumenta a permeabilidade vascular; Estimula a contração temporária do músculo liso.
Mediadores lipídicos	Leucotrienos	Regulam a resposta imune nas infeções e outras patologias.

1.5.2 Mecanismos de resposta alérgica

O processo de resposta alérgica é composto por diversos mecanismos que se desenvolvem em duas fases importantes:

- **Fase de sensibilização:** quando ocorre a primeira exposição ao alergénio.
- **Fase efetora ou resposta imediata:** em exposições subsequentes ao alergénio.

1.5.2.1 Fase de sensibilização

Ocorre quando o indivíduo é exposto primariamente ao alergénio e envolve diversos tipos celulares do sistema imunitário resultando na produção de anticorpos IgE e sua ligação aos recetores Fc dos mastócitos. É a primeira fase na reação de hipersensibilidade tipo I (Abbas et al, 2012).

Ao primeiro contacto com o antígeno são desencadeados diversos mecanismos celulares (Figura 6). O antígeno começa por ser fagocitado pelas células dendríticas (DC) aquando do contacto do alergénio com as mucosas. As células dendríticas passam de fase imatura para fase madura migrando até ao órgão linfóide secundário para proceder à apresentação antigénica. Numa fase inicial é uma célula caracteristicamente fagocítica e posteriormente, no órgão linfóide deixa de o ser fazendo a apresentação antigénica no centro germinativo dos linfócitos T e B, ativando as células T a diferenciarem-se em células "T-helper". As células "T-helper" formadas, vão evoluir no sentido de células Th₂. As células Th₂ segregam as citocinas IL-4 e IL-13 que vão estimular os linfócitos B específicos a diferenciarem-se em células B secretoras de IgE. A IgE produzida é segregada pelos linfócitos B específicos e vai ligar-se ao recetor de alta afinidade, FcεRI dos mastócitos, os quais vão ficar revestidos de IgE específica tornando-os sensíveis à ativação pela exposição subsequente ao alergénio. Os mastócitos dizem-se, assim, sensibilizados ao alergénio. Esta constituiu a etapa final da fase de sensibilização (Abbas et al, 2005).

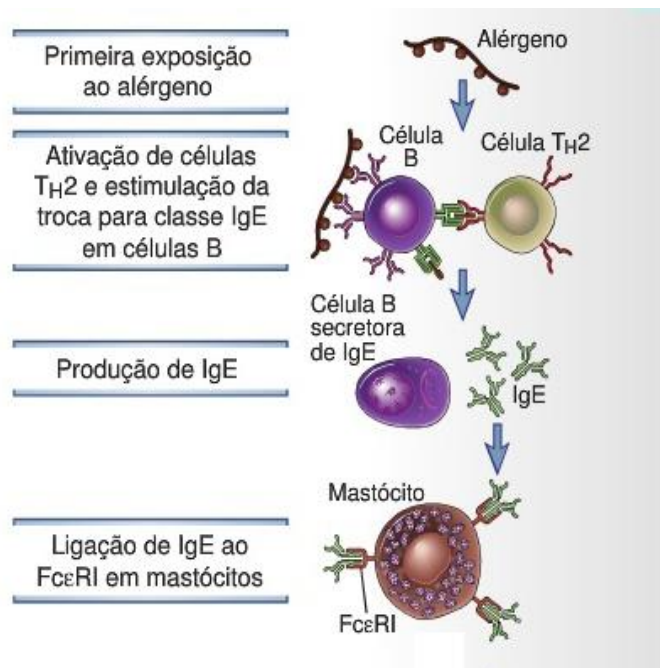


Figura 6: Sequência de mecanismos envolvidos na fase de sensibilização de uma reação de hipersensibilidade tipo I (adaptado de Abbas et al, 2012). *Alérgeno* em português significa alergénio.

1.5.2.2 Fase efetora

Ocorre quando o indivíduo é exposto sucessivamente ao antígeno. É desencadeada a libertação de mediadores químicos que dão origem aos sintomas associados, como é o caso, de histamina e de citocinas. A esta componente inflamatória dá-se o nome de reação de fase tardia (Abbas et al, 2012).

Quando existe a exposição repetida ao alérgeno (Figura 7), este irá ligar-se a IgE específicas associadas aos recetores de alta afinidade FcεRI dos mastócitos desencadeando o processo de desgranulação dos mesmos. O complexo alérgeno - IgE induz automaticamente a fosforilação de resíduos de tirosina. Esta condição vai levar à libertação do conteúdo dos grânulos (desgranulação), à síntese de mediadores lípidicos e à libertação de aminas vasoativas numa fase imediata.

As citocinas, mais especificamente a interleucina IL-13, são apenas libertadas 2-4 horas após a exposição, tendo como função a estimulação das células epiteliais das vias respiratórias para a criação de muco e de outra sintomatologia associada a uma reação do tipo alérgico (Abbas et al, 2012).

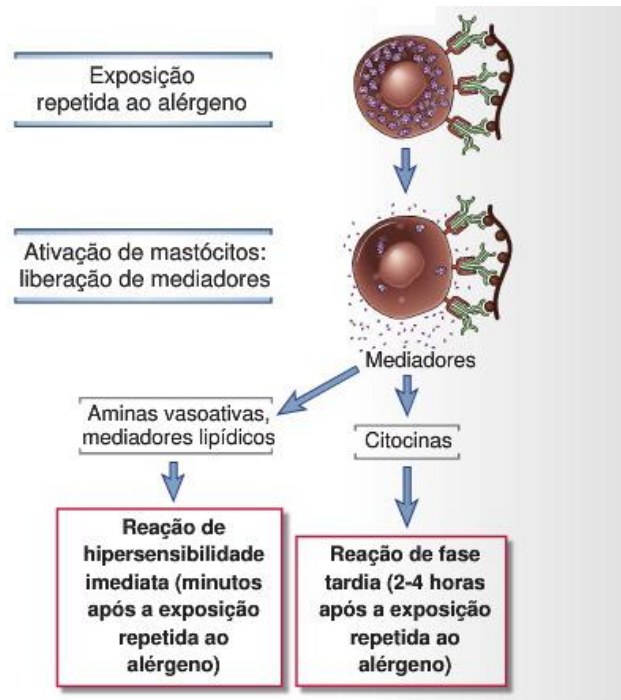


Figura 7: Sequência de mecanismo envolvidos na fase efetora de uma reação de hipersensibilidade tipo I (adaptado de Abbas et al, 2012)

1.5.3 Os Anticorpos ou imunoglobulinas: estrutura e funções

Os anticorpos são glicoproteínas formadas por cadeias polipeptídicas, agrupadas uma a uma ou por várias unidades estruturais idênticas entre si. Estão presentes no soro e nos fluidos dos tecidos de todos os mamíferos e apresentam como características principais a diversidade, especificidade e variabilidade perante toda a classe de antígenos. O seu nome comum é imunoglobulina, representada pela sigla Ig.

Existem 5 classes de anticorpos humanos distintos entre si e cada uma apresenta diferentes funções, desencadeando diferentes formas de resposta a uma substância invasora (Abbas et al, 2005). São divididas em classes (IgA, IgE, IgG, IgM, IgD) e em sub-classes com base nas diferenças estruturais da região C da cadeia pesada em que apenas só duas classes de imunoglobulinas possuem isótipos, a IgA (IgA1 e IgA2) e a IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Existe independência entre as classes de imunoglobulinas, ou seja, a produção de uma classe não significa a produção de outra. Apresentam heterogeneidade (Sánchez, 2012). As propriedades de cada um dos anticorpos referenciados estão representadas na tabela 4.

Tabela 4: Propriedades das Imunoglobulinas (adaptado de Schroeder et al, 2010; Hamilton, 2010)

Nome	Função	Peso molecular	Soro (%)	Sub-classes	Estrutura	Predominante
IgA	Proteção do organismo contra invasões virais e bacterianas.	-	15%	IgA1 e IgA2	Dímero de IgA secretora	Secreções mucosas, saliva e brônquios
IgG	Gera quimiotaxia dos neutrófilos e aumenta a permeabilidade vascular, amplificando a resposta inflamatória.	146,000	75%	IgG1; IgG2; IgG3 e IgG4	Monomérica	Intra (IgG2 e IgG3) e extra-celular (IgG1 e IgG4)
IgE	União aos antígenos desencadeando uma reação alérgica com a libertação de mediadores químicos.	-	<0,01%	-	Monomérica	Membranas dos bastócitos e mastócitos
IgM	Proteção contra antígenos do tipo infecciosos como bactérias e vírus durante a infecção ativa.	970,000	10%	-	Pentamérica	Intravascular
IgD	Diferenciação dos linfócitos desencadeada pelos antígenos.	-	<0,5%	-	Monomérica	Membranas dos linfócitos B

Cada molécula de anticorpo é constituída por duas cadeias pesadas com massa molecular individual entre 50-70 kDa e duas cadeias leves com massa molecular de 25 kDa cada uma (Figura 8). As cadeias anteriormente referidas são ligadas entre si por pontes dissulfureto e apresentam na sua constituição regiões amino-terminais variáveis (V) e regiões carboxi-terminais constantes (C) (Figura 8). As regiões variáveis, também designadas por parátopo, determinam a especificidade de cada antígeno. Estas regiões são constituídas por três curtos segmentos localizadas na região V da cadeia pesada e três curtos segmentos localizados na região da cadeia leve, que são designados por segmentos hipervariáveis (Figura 8). Numa molécula de anticorpo as três regiões hipervariáveis, ou também designadas determinantes de complementariedade (CDR) constituem o local de ligação do antígeno (Abbas et al, 2005). As outras regiões que compõem estas moléculas, designadas por fração constante (Fc) permitem distinguir os diferentes tipos de Ig. As regiões Fc interagem com os recetores específicos existentes nos diferentes tipos celulares do sistema imunitário, sendo responsáveis pela resposta imunitária associada.

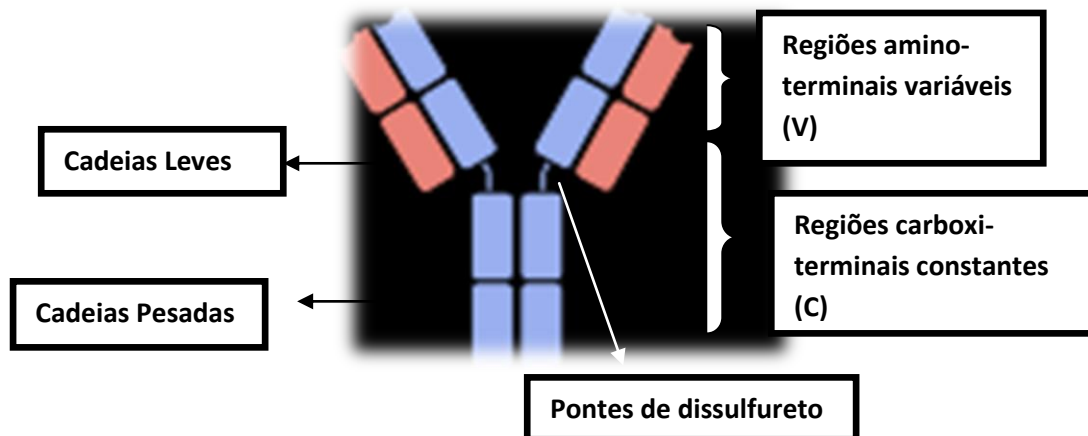


Figura 8: Esquema da molécula de anticorpo (Adaptado de R.Kaser et, 2007)

No caso de reações de hipersensibilidade tipo I, e com a exibição de sintomatologia alérgica, a imunoglobulina responsável pela defesa do organismo é a IgE (Abbas et al, 2005).

1.5.4 Reconhecimento antigénio-anticorpo e reação cruzada

A formação do complexo antigénio-anticorpo envolve uma ligação de elevada especificidade ou seletividade. A associação antigénio-anticorpo envolve várias interações não-covalentes entre o determinante antigénico, ou seja, o epítipo, e a região variável do anticorpo (particularmente nas regiões hipervariáveis e o domínio de complementariedade (CDR)). São diversas as forças envolvidas na ligação de antigénio-anticorpo, nomeadamente pontes de hidrogénio, interações iónicas, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals (Kind et al, 2006). Para além disso, a afinidade que cada molécula de anticorpo apresenta perante cada molécula de antigénio só é definida a partir da constante de dissociação (K_d) cujo valor é inversamente proporcional à afinidade entre estas duas moléculas. O K_d apresenta habitualmente valores baixos, pelo que a formação do complexo ocorre a baixas concentrações, da ordem dos nM (Abbas et al, 2005).

A reatividade cruzada (Figura 9) consiste num processo que ocorre quando um anticorpo produzido para um determinado antigénio é capaz de reconhecer outro para o qual não foi especificamente formado. É um processo que ocorre quando existe uma analogia entre as estruturas primárias e/ou terciárias dos alergénios, permitindo assim um reconhecimento

por parte do anticorpo, e é mais frequente quando o grau de analogia é superior a 80 (Bohle et al, 2006).

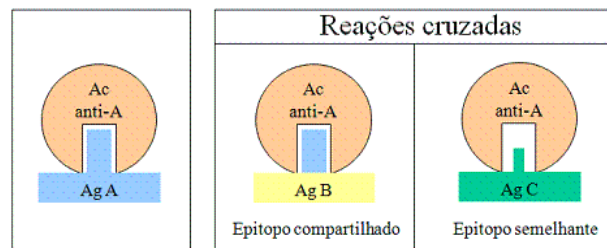


Figura 9: Mecanismo de reatividade cruzada. Representação dos diferentes antígenos (AgA, AgB e AgC) a ligar-se à forma específica do anticorpo.

A reatividade cruzada ocorrida entre diferentes espécies deve-se ao facto de o número de famílias de proteínas alergénicas ser relativamente baixo, o que potencia o reconhecimento cruzado induzido pela presença de epítomos comuns. Este reconhecimento pode ser conformacional ou sequencial dependendo da constituição dos epítomos apresentados pelas células APC aquando da fase de sensibilização, na medida em que o epítopo antigénico que se liga ao TCR pressupõe que a proteína é previamente processada (Kindt&Osborne&Goldsby et al, 2004). Em resultado disto, é espectável que seja reconhecido pela mesma IgE-específica possibilitando a ocorrência de sintomatologia alérgica (Singh et al, 2012).

São diversos os estudos publicados que apontam para reatividade cruzada entre espécies. No que diz respeito à reação alérgica a plátano, alguns estudos realizados numa população de Espanha, observaram a ocorrência de reatividade cruzada devido a uma proteína alergénica Pla a 1 (Pazouki et al, 2009).

Assim, a determinação do perfil alergológico das diferentes espécies e o esclarecimento de reatividade cruzada podem contribuir para a compreensão da sintomatologia alérgica, revestindo-se de grande relevância para o controlo da doença e a produção do bem-estar da população.

1.6 METODOLOGIAS UTILIZADAS NO ESTUDO DA SENSIBILIZAÇÃO E DOS DOS PERFIS ALERGOLÓGICOS

Para o estudo do perfil alergológico dos extratos é necessário recorrer a técnicas que permitam determinar a existência de IgE específicas, quantitativamente ou qualitativamente, que reconheçam componentes do extrato, ou seja, o estudo da sensibilização da população à espécie em estudo.

Existem diversas metodologias disponíveis para este fim e que podem envolver ou não a separação de proteínas do extrato recorrendo a técnicas eletroforéticas.

1.6.1 Testes cutâneos por picada ou “PRICK”

É uma técnica amplamente utilizada para avaliar a sensibilização mediada por IgE-específica em indivíduos atópicos. É um método seguro, pouco invasivo e relativamente indolor, que consiste na aplicação sobre a pele, de uma gota dos diferentes extratos alergénicos, seguida de picada que promove a penetração dérmica de modo a avaliar a pápula edematosa resultante da libertação de mediadores de inflamação consequentemente à ligação de IgE específica aos alergénios. A dimensão da pápula permitirá inferir sobre a intensidade da reação alérgica (Pesonen et al, 2015).

1.6.2 Quantificação de IgE por “ELISA SANDWICHE” (PRIST – Paper Radio Immuno Sorbent Test)

É uma técnica imunológica baseada no ELISA “sandwiche” para quantificação de IgE total no soro. Em primeiro lugar é necessário obter anticorpos anti-IgE unidos de forma covalente entre si a um disco de membrana com a IgE total do soro utilizado no estudo. Posteriormente é adicionado uma quantidade fixa de anticorpos anti-IgE marcados, em momento prévio, que formam complexos com as moléculas de IgE que estão unidos na membrana. Após o período de incubação, é medido a radioatividade do complexo (anti-IgE- IgE marcada – anti-IgE – disco de membrana) a partir de um contador gama. A atividade de ligação do complexo é diretamente proporcional à concentração de anticorpos IgE presentes na amostra (Sánchez, 2012).

1.6.3. RAST (*radioallergosorbent test*) para determinação de IgE - específica

Método imunológico utilizado para quantificar os níveis de IgE específica contra um alérgeno. Consiste em alérgenos ligados covalentemente a um disco de membrana, fazendo reagir com os anticorpos do soro do indivíduo, seguidamente a IgE é detetada. Os anticorpos de anti-IgE marcados unem-se com a IgE formando um complexo (anti-IgE-IgE específica marcada-alérgeno-disco de membrana). De forma indireta, pode-se fazer uma estimativa entre a concentração de alérgeno em uma amostra, quando aplicado num disco de membrana com concentração de anticorpos IgE-específicos conhecida (Agarwal et al, 1981; Jensen et al, 1989; Spijksma et al, 1990).

1.6.4 Immunocap ISAC

Imunoensaio monitorizado que permite a medição em simultâneo de IgE e IgG para componentes alérgenos diferentes, utilizando apenas uma pequena concentração de soro ou plasma. É uma técnica de diagnóstico extremamente avançada que permite revelar o perfil de anticorpos IgE do doente. É o fruto da combinação de um microchip com investigação pioneira em alergologia molecular. É o único teste *in vitro* que permite a medição de anticorpos IgE de um painel fixo de 112 componentes oriundos de 51 fontes alérgicas distintas, usando apenas 30 µl de soro ou plasma (thermoscientific.com).

1.6.5 Immunoblot

Método imunológico descrito pela primeira vez em 1979 consistindo em identificar proteínas específicas numa mistura complexa de uma amostra. É precedido da realização de uma eletroforese de focalização isoeletrica (IEF), eletroforese de SDS-PAGE ou eletroforese 2D. A eletroforese é uma técnica que permite a migração de compostos pertencentes a uma amostra que apresentam carga elétrica quando submetidos a um campo elétrico. As eletroforeses referidas atrás são específicas e distintas entre si. Enquanto que a eletroforese de focalização isoeletrica permite separar proteínas na conformação nativa de acordo com o seu ponto isoeletrico (pI) num gradiente de pH estável em gel de agarose ou policrilamida, a SDS-PAGE permite separar proteínas desnaturadas de acordo com o seu peso molecular. A

electroforese 2D combina estes dois tipos já referidos. As proteínas resultantes das eletroforeses são transferidas para uma membrana de PVDF, nitrocelulose ou nylon através dum processo de eletrotransferência ou por capilaridade. A membrana constitui uma matriz estável onde as proteínas podem ser imunodetetadas (Jin & Kennedy et 2015).

2. OBJECTIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo geral a caracterização do perfil alergológico do pólen de *Platanus Hybrida*, espécie abundante da cidade de Évora.

2.1.1 Objetivos específicos

Procurou-se então:

- 1) Caracterizar a distribuição de *Platanus hybrida* na cidade de Évora como potencial indicador da exposição da população;
- 2) Preparar um extrato aquoso rico em proteínas solúveis, para tal recorreu-se à colheita do pólen, à extração do mesmo com tampão aquoso;
- 3) Caracterizar o perfil proteico do pólen de *Platanus Hybrida*, recorrendo a métodos eletroforéticos, IEF e SDS-PAGE;
- 4) Averiguar a existência de indivíduos com sensibilização ao pólen de *Platanus hybrida* recorrendo a uma técnica de “RAST modificado”;
- 5) Analisar a eventual ocorrência de reatividade cruzada com gramíneas recorrendo à técnica “RAST modificado” após inibição dos soros com extrato de *Dactylis glomerata*;
- 6) Identificar bandas imunorreativas após separação eletroforética, IEF e SDS-PAGE.

3. PROBLEMÁTICA

A prevalência de alergia tem vindo a aumentar em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Estima-se que cerca de 20% da população mundial sofre de doenças alérgicas mediadas por IgE, havendo vários estudos que apontam a elevada exposição a alergénios como um fator decisivo no desenvolvimento das doenças alérgicas em indivíduos propensos. Os pólenes constituem a segunda maior causa de alergias respiratórias. A polinose, também designada alergia respiratória causada por pólen, é uma doença alérgica que afeta 25% dos indivíduos alérgicos (Varela et al, 1997). No Alentejo, as gramíneas e a oliveira têm sido consideradas as espécies mais relevantes do ponto de vista alergológico, quer pela abundância quer pela alergenicidade do seu pólen (Todo-Bom et, al 2006). Todavia tem-se observado um desajuste dos sintomas de polinose face à época de polinização destas espécies, sugerindo que outras espécies da região, não caracterizadas até agora, poderão estar a contribuir para a ocorrência deste tipo de doença alérgica. A espécie *Platanus hybrida* é uma árvore muito utilizada para fins ornamentais e conseqüentemente, abundante em parques e ruas das cidades, sendo a exposição da população a este pólen elevada nestes locais (o pólen de plátano é o 4º tipo polínico mais abundante na cidade de Évora representando 14% do pólen de árvores e cerca de 8% do total, logo a seguir à oliveira durante a fase de polinização compreendida entre os meses de Março e Abril (Caeiro et, 2014)). Embora o plátano não seja classificado no grupo de plantas mais alergénicas, a elevada exposição a este tipo polínico poderá ser responsável pela indução de polinose (Varela et al, 1997). De facto, embora o perfil alergénico deste pólen esteja ainda pouco caracterizado, estão já identificados alguns alergénios, de Pla a 1 a Pla a 8 ([1]; Pazouki et al, 2009; Fernández-González et al, 2013). Para além de estar ainda pouco caracterizado do ponto de vista do conteúdo em alergénios, desconhece-se também quer a prevalência da sensibilização da população quer da sua repercussão na doença alérgica respiratória.

Assim os objetivos deste trabalho são a caracterização do perfil em alergénios do pólen de *Platanus hybrida*, espécie característica da cidade de Évora, e avaliar a prevalência da sensibilização a este tipo polínico bem como a sua relevância para a polinose na população alérgica de Évora.

4. METODOLOGIA

4.1 Procedimento experimental

4.1.1 Colheita do pólen

A colheita do pólen de *Platanus hybrida* foi efetuada entre os meses de (Abril-Junho) de 2015. As estruturas que possuíam as anteras foram recolhidas diretamente da árvore através de utensílios de corte e inserida num envelope. De seguida, colocou-se o envelope no exsicador (recipiente de vidro selado de forma hermética contendo um material dessecante formado por cristais de sílica) a fim de reduzir a humidade do material, permitindo a secagem e evitando a criação de fungos. Esperou-se mais ou menos duas semanas para que todas as anteras secassem e libertassem o pólen. Posteriormente a esta etapa, o pólen libertado foi recolhido em micro tubos previamente pesados. O pólen de *Dactylis glomerata* foi obtido comercialmente da firma Allergon AB, Suécia.

4.1.2 Extração do conteúdo proteico polínico

As amostras de *Platanus hybrida* (0,05g) e *Dactylis glomerata* (0,05g) foram introduzidas dentro de tubos de falcon. De seguida, iniciou-se o processo de extração proteica adicionando a cada amostra de pólen 10 ml de tampão de extração de bicarbonato de amónio (8g de NH_4HCO_3 ; 700 μL de NH_4 para 1 L H_2O), que ocorre durante 4h, com agitação rotativa a 60 rpm e mantendo as amostras protegidas da luz. Passadas as 4h, centrifugou-se a 15000g durante 10 minutos e de seguida recolheram-se os sobrenadantes em dois tubos de falcon devidamente identificados. Os sedimentos foram posteriormente macerados a seco em almofariz, para desfazer os grãos de pólen que ainda pudessem eventualmente estar íntegros. Arrstaram-se então os macerados novamente para os tubos de falcon originais, e adicinou-se mais 10ml de tampão de extração, adicionados por duas vezes, para permitir efetuar a lavagem do almofariz. Esta segunda extração decorreu durante 2h, em condições de rotação e isolamento da luz semelhante à primeira. Seguiu-se nova centrifugação a 15000g 10 minutos. Os sobrenadantes foram adicionados aos anteriores para posterior liofilização. Os sedimentos foram descartados. Os sobrenadantes foram então preparados para a liofilização. Para isso cada um deles foi aliqotado em volumes de 2ml, que se guardaram em tubos de falcon de 10 ml previamente pesados. Em seguida, são reservados em ultra-congeladora (-80°C) até haver disponibilidade para fazer a liofilização, que ocorreu no laboratório de Nutrição do ICAAM (Herdade da Mitra, Universidade de Évora). A

liofilização é uma técnica que permite a processo de secagem que consiste na remoção de água por sublimação. Neste caso, os constituintes dos tampões de extração volatilizam no processo de liofilização (libertando-se CO_2 e NH_3), obtendo-se um sedimento sólido constituído pelos compostos extraídos do pólen. À temperatura ambiente, pesaram-se os tubos dos liofilizados e, por subtração do peso do tubo vazio, obteve-se a massa de extrato de cada tubo.

4.1.3 Quantificação da proteína total – Método de Bradford

A quantificação da proteína foi realizada a partir do método de Bradford. Baseia-se na adsorção do corante **comassie-brilliant blue** à proteína. Construiu-se a curva de calibração com os padrões de BSA entre as concentrações 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras foram diluídas em água, seguindo os fatores de diluição (10x, 20x e 40x). o branco de ensaio realizou-se com água destilada. As amostras, os padrões e o branco foram aplicados numa micro placa, em triplicado, 10 μL de cada. Adicionou-se 200 μL de reagente de Bradford. A reação decorre em 5 minutos, tempo após o qual pode ser feita a leitura de absorvância num aparelho de leitura de micro placas a 630nm ou 590nm à temperatura ambiente.

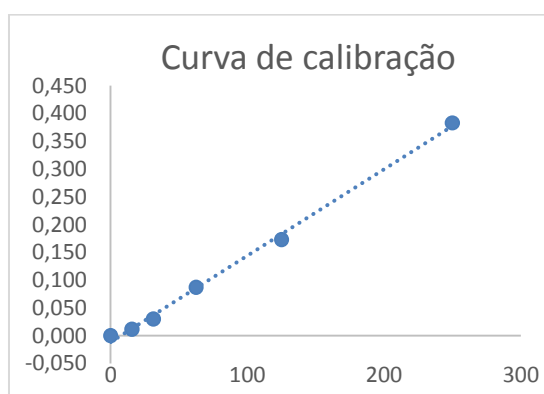


Figura 10: Curva de calibração obtida através do método de Bradford, utilizando padrões de BSA

4.1.4 Estudo do perfil proteico polínico por eletroforese de focalização isoelétrica

A eletroforese de focalização isoelétrica (IEF) é uma técnica separativa que permite a separação de proteínas com base no seu pI.

Seguiu-se o procedimento experimental descrito no catálogo do equipamento - **Model 111 Mini IEF Cell da BioRad**, contém dois elétrodos de grafite a uma distância de 5 cm um do outro. Estes elétrodos podem remover-se do local do aparelho para possível lavagem ou humidificação.

A tensão aplicada é de 450 volts, suficiente para a criação de bandas com boa separação e com aspecto nítido para posterior análise (IEF standards Instruction Manual Catalog Number 161-0310, 2000). Inicialmente preparou-se a película que servirá de suporte ao gel, identificando a face hidrófoba da película. Nesta face são colocadas algumas gotas de água e, de seguida, nessa mesma superfície, justapôs-se um vidro de superfície equivalente. A água em excesso foi expelida, funcionando a que ficou retida entre as duas superfícies como “cola”. Este vidro dá mais estrutura à película durante todo o processo, desde a preparação do gel à eletroforese propriamente dita. O conjunto foi então colocado num suporte para preparação do gel, com película virada para baixo. Preparou-se a solução base de polimerização com a seguinte constituição:

- 2,75ml de água destilada;
- 1,5ml de concentrado de monómeros;
- 1ml de Glicerol;
- 0,25ml de anfólitos.

Catalisadores:

- 15 μ L de Persulfato de Amónio (0,020g para 200 μ L de H₂O);
- 5 μ L de TEMED;
- 25 μ L de Riboflavina.

Num tubo de 15 ml adicionaram-se todas as soluções anteriores de modo rápido, para evitar que a polimerização se inicie de imediato. Pipetou-se esta solução até encher todo o espaço entre a película e o suporte. Como este gel é foto-polimerizado, colocou-se o suporte sob radiação ultravioleta (ver equipamento na figura 11) cerca de 1h.



Figura 11: Luz foto-polimerizadora.

De seguida retirou-se o gel do suporte, virando-o e esperando mais ou menos 5 a 10 minutos à temperatura ambiente, sob a mesma fonte de radiação para garantir que não ficavam monómeros não polimerizados. De seguida, depois de observarmos o gel formado, efetuou-se a adição de 1 μL de padrão (GE Healthcare, 2013) e 2 μL de amostra do extrato do pólen, no molde próprio pertencente ao equipamento, esperando 5 minutos para absorção pelo gel. Posterior a esta etapa, coloca-se o gel no equipamento de corrida, humedecendo previamente os elétrodos de grafite, para manter o local húmido e evitar que o gel seque, e coloca-se o gel sobre os elétrodos (isto é, inverte-se sobre os elétrodos, ficando virada para o operador a placa de vidro). Fecha-se então o equipamento de corrida (ver figura 10), e efetua-se a corrida eletroforética durante 1h30min, à temperatura ambiente, com as seguintes características:

- 100V -15 minutos;
- 200V - 15 minutos;
- 450V - 1h.



Figura 12: Equipamento de corrida eletroforética IEF utilizado.

Depois de terminada a corrida eletroforética, desligou-se a fonte de alimentação retira-se o gel (que se manterá sempre justaposto à película). O vidro pode ser retirado nesta fase. Este gel pode ser revelado, para identificação do perfil proteico, ou transferido para uma membrana, para posterior estudo imunológico. Para ser revelado, o gel é colocado numa solução fixadora (30% de metanol; 5% TCA; 3,5% ácido sulfossalicílico) durante 15 minutos e seguidamente coloca-se durante 2 horas no corante, sobre agitação. Passado esse tempo, retirou-se o gel do corante e colocou-se *overnight* no descorante I (28% etanol; 14% ácido acético glacial; 0,5% sulfato de cobre

II). No dia seguinte, colocou-se o gel no descorante II (25% etanol; 7% ácido acético) até se obter uma boa definição das bandas. Assim que isso acontece, o gel é retirado da solução e deixado ao ar, secando aderente à película.



Figura 13: *Gel-Doc system e software (Bio-Rad).*

O passo seguinte foi a observação do gel sob luz branca, o que ocorreu no equipamento Gel-Doc system (ver figura 13), identificando-se as bandas do padrão e das amostras aplicadas, e procedendo-se ao cálculo do pI das amostras, com base nas bandas do padrão, cujo pI é conhecido (ver tabela 6), construindo-se uma curva de calibração (pI versus distância percorrida).

Tabela 5: Valores de pI do padrão da Bio-rad referente à eletroforese de focagem isoelétrica.

Padrão	pI
cit C	9,6
Lentil Lectin -1	8,2
Lentil Lectin -2	8
Lentil Lectin -3	7,8
Hemog. C	7,5
Hemogl. A	7,1
Equine myogl	7
Equine myogl minor	6,8
Human CA	6,5
Bov. CA	6
beta-Lactoglob	5,1
Phycocyanin	4,75
Phycocyanin	4,65
Phycocyanin	4,45

Para se proceder à transferência para a membrana, o gel é retirado do suporte do aparelho eletroforético. Posteriormente, coloca-se a membrana PVDF previamente ativada em metanol durante 5 segundos e em água durante 1 minuto, em cima do gel sem formar bolhas de ar, de seguida coloca-se em cima da membrana 3 folhas de papel aderente e 3 folhas de papel de filtro cobrindo com um vidro e colocando um peso para que tudo o que tiver no gel passar para a membrana e aguarda-se 40 minutos. Findo este tempo, retira-se a membrana e pode iniciar-se a imunomarcção. Este procedimento está descrito um pouco mais à frente no subcapítulo 4.1.6.3.

4.1.5 Estudo do perfil proteico polínico por eletroforese de gel poliacrilamida SDS-PAGE

A eletroforese em gel poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) é uma técnica separativa que permite a separação de proteínas com base na sua massa molecular.

Inicialmente procedeu-se à montagem do sistema de suporte dos géis. Será primariamente preparado um gel de resolução e, após a polimerização deste, um gel de concentração. As constituições são as seguintes:

✓ **O gel de resolução (7,5 %) é assim composto:**

- 3,1mL H₂O;
- 2,5mL Tris-Chl (1,5M) com pH de 8,8;
- 100 µL de SDS (10%);
- 4,3mL Bis/Acrilamida (30%);
- 75 µL de APS (10%);
- 10 µL de TEMED.

✓ **O gel de concentração a (4%) é composto:**

- 3,05mL de H₂O;
- 1,25mL Tris-Chl (0,5M);
- 50 µL de SDS (10%);
- 0,65mL Bis/Acrilamida (30%);
- 75 µL de APS;
- 5 µL de TEMED.

Aplicou-se a solução para o gel de resolução entre os dois vidros, colocando-se água cuidadosamente na superfície para reduzir o contato do gel com o oxigênio atmosférico (que pode inibir a polimerização) e ainda contribuir para um topo do gel linear. A polimerização do gel de resolução demora cerca de 45 minutos. Depois de polimerizado, retirou-se a água e aplicou-se a solução para o gel de concentração, introduzindo entre os vidros do suporte um pente que permite a formação dos poços das amostras, deixando novamente polimerizar durante um período de tempo de 45 minutos a 1h. Neste intervalo de tempo, prepararam-se as amostras adicionando tampão da amostra (Tris – HCl 300 mM, pH 6,8; SDS 12%; Glicerol 30%; Azul de bromofenol 0,06% ditiotritol 600mM) que contribuiu para a desnaturação proteica (pela presença de SDS) e leva à quebra das ligações persulfureto (pela presença de uma agente redutor, o ditiotreititol) aquecendo-as a 95 ° C num banho seco durante 5 minutos, o que contribui para desnaturação térmica das proteínas. Após a polimerização do gel de concentração, o gel foi colocado na tina eletroforética. O reservatório interno e o externo foram cheios com tampão de corrida (Tris-HCL 125 mM, pH8,3; Glicina 0,96%; SDS 0,5%) seguindo-se a aplicação do padrão (SDS-PAGE Standards Instruction Manual Catalog) (5µL) e das amostras (20 µL) no gel (ver figura 12). Posteriormente a esta etapa ligou-se a fonte de corrente a **140V; 60 mA e 15 W**.



Figura 14: Suporte do aparelho de corrida eletroforética SDS-page.

Depois da corrida eletroforética terminada, retirou-se o tampão de corrida do suporte e retiram-se os géis. Os géis podem ser revelados, para análise do perfil proteico, ou as proteínas nele separadas transferidas para uma membrana. Para revelar os géis, colocam-se numa solução corante (MeOH 45%; ácido acético 10%; Coomassie 0,5%) sobre agitação durante 2h. Passado este tempo, colocou-se numa solução descorante (MeOH 30%; ácido acético 10%) deixando pelo

menos 24h sobre agitação. O último passo é a revelação no aparelho de luz branca, com a identificação das bandas correspondentes e a medição da distância das bandas ao topo do gel com o auxílio do aparelho *Gel-Doc system e software* (Bio-Rad) representado na figura 13.

Para transferir as proteínas do gel para uma membrana, com o objetivo de fazer a sua imuno-marcação, realiza-se um procedimento designado Western-blotting, que descreveremos mais a frente.

4.1.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL ALERGOLÓGICO DO PÓLEN DE *PLATANUS HYBRIDA* E *DACTYLIS GLOMERATA*

4.1.6.1 Estudo da sensibilização (deteção de soros positivos) ao pólen de *Platanus hybrida* e *Dactylis glomerata* e determinação da ocorrência de reatividade cruzada com extrato de *D.glomerata* (RAST adaptado)

Neste trabalho foi desenvolvido um método, considerado um teste de “RAST adaptado” que permite uma rápida avaliação da sensibilização de indivíduos ao extrato total polínico. Neste método de “RAST adaptado”, são cortados discos de membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) com diâmetro suficiente para cobrir o fundo do poço de micro placa de 96 poços (20 mm² de área), onde são colocados. Todo o teste é realizado nessa micro placa. Após o bloqueio com BSA (TBS-T com 1% de BSA) o extrato polínico é aplicado diretamente nesses discos. Foi realizado em apenas um único ensaio, o teste de sensibilização a *Platanus hybrida* e *Dactylis glomerata* (em soros que apresentavam polinose) e determinação da ocorrência de reatividade cruzada com o extrato de *Dactylis glomerata*. Ambos os testes foram realizados com o mesmo procedimento experimental. Aplicaram-se soros diluídos de pacientes de polinose (designados “soros não inibidos”) e soros previamente incubados com extrato de *D.glomerata* (designados “soros inibidos”, por se considerar que IgE com afinidade para alérgenos de *D. glomerata* ficam ligados a estes e já não estarão disponíveis para outras ligações menos específicas). Posteriormente e por último, aplica-se anticorpo secundário anti-IgE humana, marcado com uma enzima, a fosfatase alcalina [7]. Entre cada mudança de reagente, são realizadas lavagens sucessivas, à semelhança de outras técnicas de imunomarcação, com TBS-T (Tris-HCL; NaCl; Tween-20 (0,1%) pH 7,6). A revelação da reatividade positiva é feita aplicando um substrato desse enzima, neste caso o reagente fluorescente ECF Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). A fluorescência de toda a placa é observada simultaneamente por captação de imagem no Bio-rad Gel-doc, sob radiação fluorescente.

Aplicam-se seguidamente soros de pacientes e soros de pacientes previamente inibidos com extrato de *Dactylis glomerata* (10 µL).



Figura 15: Exemplo de uma micro placa utilizada para a deteção imunológica na sensibilização ao pólen.

O software deste equipamento (Quantity-One) permite ainda fazer a comparação da intensidade de fluorescência de cada poço.

O método desenvolvido, além da simplicidade, permite comparar diversas situações num único ensaio, tendo também sido utilizado para otimização das concentrações ideais de anticorpo primário (soros) e de anticorpo secundário.

Durante os estudos de otimização, testaram-se as diluições de anticorpo primário (soros de pacientes) 1:50, 1:100 e 1:200 e as diluições de anticorpo secundário 1:1000, 1:3000, 1:6000, 1:10000, 1:12000, 1:15000 e 1:24000. Depois de vários procedimentos efetuados determinaram-se as condições ideais de ambos os anticorpos. No que diz respeito ao anticorpo primário a diluição mais adequada é de 1:100 e em relação ao secundário é de 1:12000. O passo seguinte foi o estudo da imunoreatividade dos soros, a ambas as espécies, de pólen em estudo. Todos os soros testados foram cedidos pelo hospital Espírito Santo de Évora, oriundos de pacientes anónimos que apresentavam polinoses. Foram utilizados 10 soros com nomenclaturas diferentes: **S1: PC 203 Fev (2013 sR), S2:PC 202 47 579, S3:PC 204 39 983, S5:PC 201 37 077, S6:PC 203 86 963, S7:PC 203 98 986, S8:PC 201 35 866, S9:PC 201 07 207 e S10:PC 201 73 122; S12: PC 203 34 446.**

Descreveremos agora o procedimento mais detalhado. As membranas, após cortadas e colocadas na micro placa, foram ativadas com metanol e lavadas com água destilada.

Seguidamente, revestiram-se com extrato total aguardando 30 minutos para absorção. De seguida retirou-se o excesso e aplicou-se 50 µL da solução de bloqueio, aguardando-se 1h, sob agitação e à temperatura ambiente. Retirou-se depois esta solução e adicionou-se 50 µL de cada soro acima descrito e os soros previamente inibidos com extrato de *Dactylis glomerata*, incubando-se 2h à temperatura ambiente, sob agitação, para permitir a reação imunológica. Findo esse tempo, adicionou-se 50 µL de anticorpo secundário na diluição de 1:12000 e esperou-se novamente 2 horas para atuação. O passo final foi a revelação com a adição de 25 µL de substrato.

4.1.6.2 Transferência eletroforética SDS-PAGE

Para realizar a transferência eletroforética de proteínas separadas num gel para membranas de PVDF, primariamente ativou-se a membrana com metanol durante 5 segundos e em água durante 1 minuto. Este passo é bastante importante porque potencia a união das proteínas à membrana. De seguida introduzem-se as membranas em recipientes com tampa, submersas em tampão de transferência (Tris 25mM, pH8,3; Glicina 192mM; MeOH 20%; 0,037% SDS). Posteriormente retiraram-se os géis do suporte e colocaram-se no mesmo recipiente onde estavam as membranas. Cada membrana deve estar com um corte identificativo no canto superior esquerdo que auxilia a perceção do lado direito da membrana durante todo o manuseamento da mesma. O gel e a membrana devem permanecer em solução de transferência cerca de 15 minutos, com o recipiente fechado. Como o tampão de transferência tem metanol, ocorrerão alterações na estrutura do gel, e convém que quando se inicia a transferência, este já tenha adquirido uma estrutura estável. Após esse tempo, prepararam-se as cassetes, compostas por 2 fibras, 2 ou mais folhas de papel de filtro, a membrana e o gel. Na figura (13 A) pode visualizar-se a ordem correta de todas as componentes da cassette. Cada um destes componentes tem que ser humedecido, garantindo que não existem bolhas de ar entre as várias camadas, para que a corrente elétrica atravesse a cassette e arraste as proteínas do gel para a membrana.

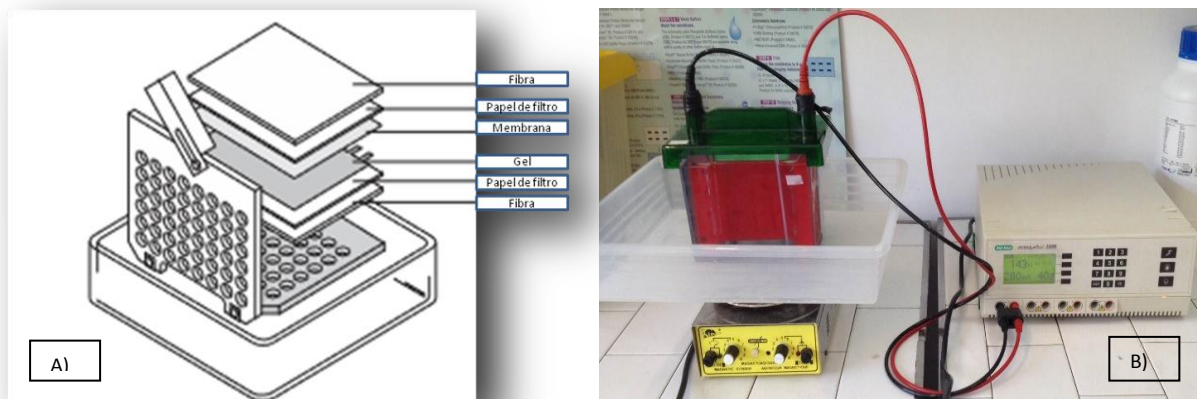


Figura 16: A) Constituição de "Sandwich" para transferência eletroforética. (adaptado do Manual Western-Blot da Bio-rad, 2014). B) Equipamento de transferência eletroforética.

Todo este processo de montagem foi feito dentro de um recipiente com tampão de transferência. Na montagem do sistema para a corrida de transferência colocaram-se as duas "sandwichs", cada uma com a sua membrana, dentro da tina, preenchido com tampão de transferência e um magneto para agitação. Tem ainda que se colocar uma unidade de arrefecimento para absorver a energia calorífica de joule gerada durante a transferência eletroforética, evitando-se com esta tina (Mini-transblot Bio-RAD) a necessidade de um equipamento de arrefecimento externo. Depois da devidamente montagem, as condições de corrida são **350 mA; 150V e 40 W**. Após a corrida estar completa abre-se a "sandwich" do blotting e removeu-se a membrana.

Ainda antes da imunomarcação, fez-se uma revelação das proteínas com a solução corante Ponceau S (0,2% Ponceau S; ácido acético 3%). A membrana foi submersa nesta solução durante 5 minutos, e lavadas abundantemente com água destilada. As proteínas reagem reversivelmente com o corante, permitindo avaliar nesta fase do processo de todas as "lanes" estão com quantidades de proteínas equivalentes ou, eventualmente, detetar e marcar a lápis os locais onde cortar cada membrana em vários segmentos, pois as "lanes" visualizaram-se bem. Normalmente faz-se uma imagem da membrana corada com Ponceau S, usando um scan convencional ou uma máquina fotográfica digital. Com os procedimentos seguintes, esta marcação desaparece.



Figura 17: Membrana após transferência eletroforética corada com solução Ponceau S.

4.1.6.3 Imunomarcação

A imunomarcação inicia-se com o bloqueio. Para isso, colocaram-se as membranas numa solução bloqueio com leite magro em pó (10g para 200 ml de TBS-T), durante 1h30/2h.

Posteriormente efetuou-se apenas uma lavagem com TBS-T para retirar o excesso de leite e cortou-se a membrana (de acordo com as marcas do lápis feitas anteriormente) para posterior incubação a 4^o C com os anticorpos primários (40 µL em 3960 µL de TBS-T). Os anticorpos primários utilizados foram previamente selecionados a partir do teste de soros positivos efetuado para esta espécie pelo método de deteção imunológica descrito em cima. Foram então utilizados para Blot os seguintes soros: **S1: PC 20 Fev (2013 Sr), S5: PC 201 37 077, S6: PC 203 86 963, S7: PC 203 98 986, S10: PC 201 73 122 e S12: PC 203 34 446.**

Posteriormente à aplicação dos anticorpos primários retiraram-se as membranas e efetuaram-se 3 lavagens durante 10 minutos com solução de lavagem com leite magro em pó (2g para 200 ml de TBS-T) sobre agitação. Aplicou-se de seguida o anticorpo secundário numa concentração de 1 µL para 12000 µL de TBS-T sobre agitação, durante 2h. O passo final foi a revelação. Aplicou-se sobre uma superfície hidrofóbicas gotas de substrato (o mesmo indicado acima para o “RAST modificado”, e a membrana foi colocada cuidadosamente sobre o substrato (+ ou - 1 ml por membrana). A reação ocorreu durante cerca de 1 minuto, tempo ao fim do qual a membrana foi retirada, o substrato em excesso foi absorvido num papel de filtro e procedeu-se à observação das bandas imunoreativas no equipamento de aquisição de imagem já mencionado e apresentado na figura 13.

4.2 MATERIAL E EQUIPAMENTO

- **Material**

- Almofariz;
- Pilão;
- Luvas descartáveis;
- Espátulas;
- Pinças;
- Micropipetas P10, P20, P100, P200, P1000 P5000 e respectivas pontas estéreis e não estéreis;
- Máscaras descartáveis;
- Magnetes;
- Microtubos (2ml) estéreis e não estéreis;
- Micropipeta multicanal;
- Para - filme;
- Micro-placas;
- Tubos de Falcon (15 mL e 50 ml) estéreis e não estéreis;
- Membrana PVDF;
- Membrana de nitro-celulose;
- Esguicho;

- **Equipamentos:**

- Balança;
- Bio-Rad Gel-doc (sistema e software);
- Trans-Blot Electroforetic Transfer Cell da Bio-Rad;
- Leitor de microplacas;
- Sistema de IEF Model 111 Mini IEF Cell da Bio-Rad;
- Agitador magnético;
- Banho seco (Grant);
- Centrifuga;
- Medidor de pH: Inolab pH Level 1;

4.3. REAGENTES

- Reagente de Bradford (para 1L, 100 mg de Azul de Coomassie G-250 em 50mL de etanol a 95%; 100mL de ácido fosfórico a 85%);
- H₂O destilada e Bi-destilada;
- DTT;
- Glicerol;
- Tris-Chl (0,5M);
- SDS;
- Metanol;
- Bis/Acrilamida;
- APS;
- TEMED;
- Metanol;
- BSA;
- Riboflavina;
- Anfólitos;
- Concentrado de monómeros;
- Persulfato de Amônio;
- Tampão de transferência (3,03 g de Tris; 14,4 g de glicina; 200 ml de metanol e 3,7 ml de SDS);
- Ponceau S (0,2%) com a constituição de 0,2 g de ponceau S adicionado a 3 ml de ácido acético;
- Tampão de corrida 10x;
- Tampão de corrida SDS-page;
- TBS 10x;
- TBS-T;
- Tween 20;

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Biodistribuição de *Platanus hybrida* na Cidade de Évora

Um dos aspetos relevantes para o desenvolvimento de reações alérgicas ou de hipersensibilidade tipo I é a exposição aos agentes causadores da mesma. Neste sentido procurou-se averiguar a biodistribuição do plátano na cidade de Évora.

A figura 18 ilustra os locais onde são encontrados plátanos (*Platanus hybrida*) na cidade de Évora. Geralmente, este tipo de planta encontra-se disposta de forma mono-espécie, na maioria dos locais, à exceção do local H), relativo ao jardim público, em que para além de não ser muito abundante está acompanhada por outras árvores de elevado porte.

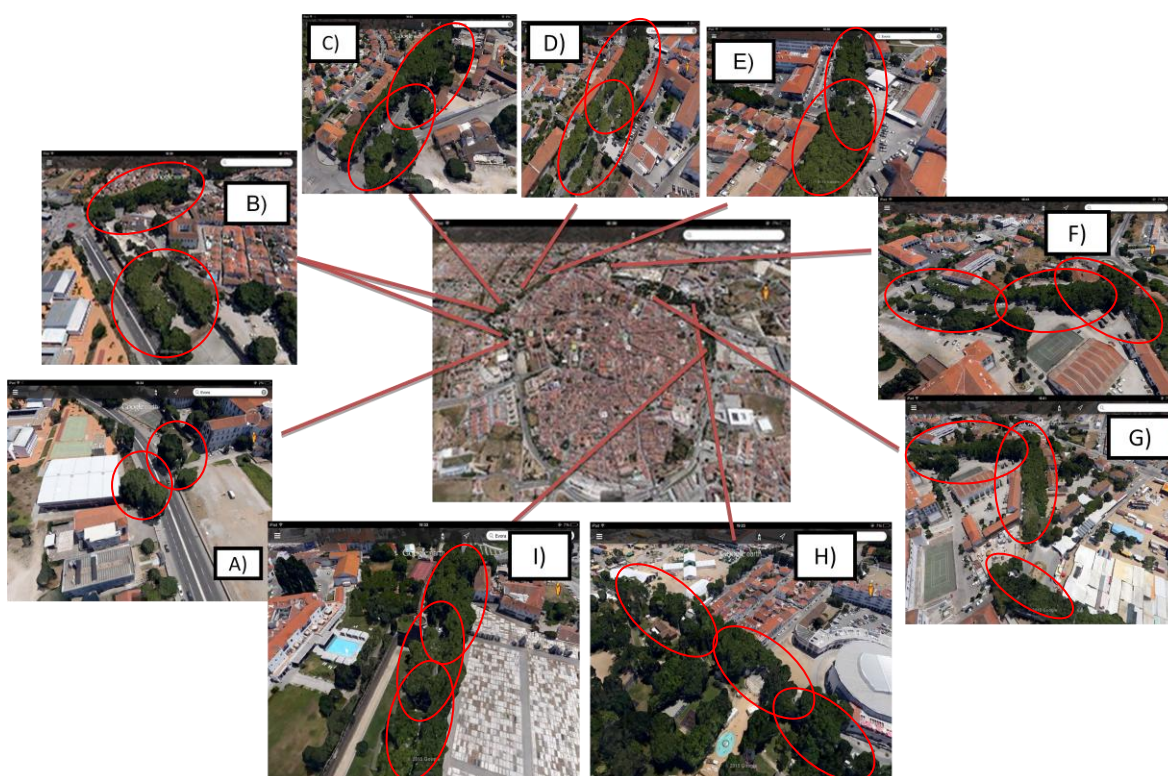


Figura 18: Imagens aéreas de diversos locais da cidade de Évora onde se encontram os plátanos. Estes locais estão concentrados dentro do centro da cidade de Évora. A) e B) Nacional 18 junto ao colégio Espírito Santo; C), D) e E) Avenida São João de Deus; F) Avenida dos Bombeiros voluntários de Évora; G) Avenida Fundação Calouste Gulbenkian; H) Avenida General Humberto Delgado; I) Avenida D. Nuno Álvares Pereira [6].

Nos locais identificados (ver figura 18 e 19) com as letras A) e B), Estrada Nacional, 18, junto ao colégio Espírito Santo, encontram-se 44 *P. hybrida*, que cobrem de forma singular 650 m correspondentes à extensão da avenida. Este valor inclui aqueles que se encontram disposto no

parque de estacionamento ao lado da residência Manuel Álvares e no interior do Colégio do Espírito Santo da universidade.

No que se refere aos locais C), D) e E), relativas à Avenida São João de Deus, as árvores de *P. hybrida* encontram-se dispostas de forma paralela, tendo sido contabilizadas 120 ao longo de 700 m, desde o início até ao final da avenida, encontrando-se 3 no jardim do Hospital do Espírito Santo. Na zona F) Avenida dos Bombeiros voluntários de Évora, e incluindo a avenida da Fundação Calouste Gulbenkian, zona G), encontram-se 80 *P. hybrida*, cobrindo os 500 m ao longo das avenidas, alinhados entre si e localizados no passeio onde circulam peões. Apenas 1 árvore se encontra no jardim da escola primária localizada na avenida Fundação Calouste Gulbenkian.

Na zona H), Avenida General Humberto Delgado, estão situadas 101 árvores desta espécie dispostas de forma idêntica ao anteriormente referido, ao longo de uma extensão de 550 m. No jardim público, encontram-se 23 árvores dispersas entre si por toda a área do jardim, e outras encontram-se junto ao hotel Íbis, cobrindo a área do jardim do hotel. Por último, na zona I), Avenida D. Nuno Álvares Pereira, encontram-se 46 *P. hybrida* alinhadas entre si, ao longo de 280 m, cobrindo toda a área da avenida.

Para além dos locais identificados no mapa (Figura18), onde predomina esta espécie, estão localizadas árvores em zonas que não se encontram identificadas no mapa, nomeadamente 2 plátanos na Vista Alegre junto a habitações, 7 na rotunda das Portas da Lagoa, 4 junto ao aqueduto e por fim 2 muito próximas da rotunda das Portas de Avis. No total foram contabilizados 438 árvores envolvendo o centro histórico da cidade (Figura 19).

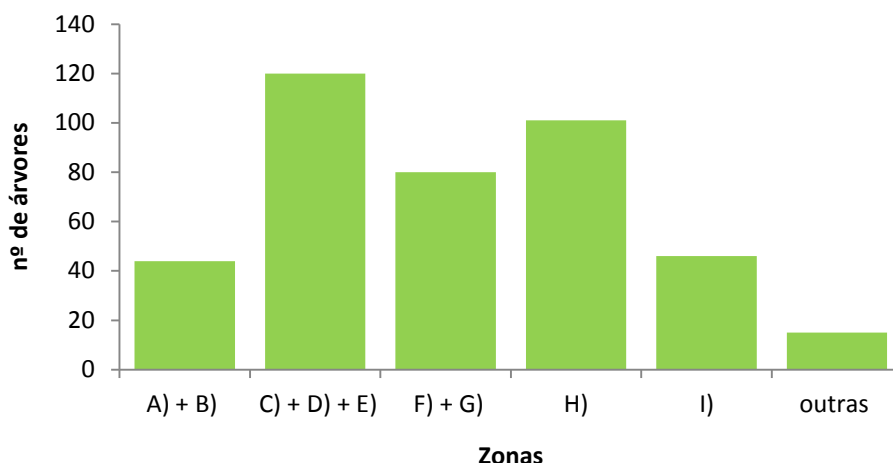


Figura 19: Biodistribuição geográfica de *Platanus hybrida* nas zonas de maior abundância na cidade de Évora. Zona A) e B) Estrada nacional, 18, junto ao colégio Espírito Santo; C), D) e E) Avenida São João de Deus; F) e G) Avenida dos bombeiros voluntários e avenida Calouste Gulbenkian; H) Avenida General Humberto Delgado; I) Avenida D. Nunes Álvares Pereira.

Todos os locais descritos apresentam uma elevada abundância de *P. hybrida*, donde se concluiu que é uma árvore predominante junto ao centro histórico da cidade de Évora. Todos os espaços identificados são urbanos. De facto, situam-se maioritariamente em redor da muralha da cidade, influenciando zonas onde se encontram instituições de serviço público importantes tais como o Hospital Espírito Santo e o colégio Espírito Santo, este último corresponde ao edifício central da Universidade de Évora. Estes locais, pelas suas características e funções no espaço urbano, são naturalmente potenciadores de uma elevada exposição pois encontram-se no foco de elevada concentração e circulação populacional.

5.2 Determinação do perfil proteico de um extrato solúvel de pólen de *P.hybrida*

Para determinação do perfil proteico do extrato pólen de *Platanus hybrida* e de *Dactylis glomerata* foram efetuadas separações por eletroforese IEF e SDS-PAGE.

5.2.1 Determinação do perfil proteico de acordo com o ponto isoeléctrico - IEF

As imagens representadas no painel seguinte da figura 20 mostram dois eletroforetogramas representativos dos géis realizados para separação de proteínas dos extratos de *Dactylis glomerata* e *Platanus hybrida* pela técnica IEF.

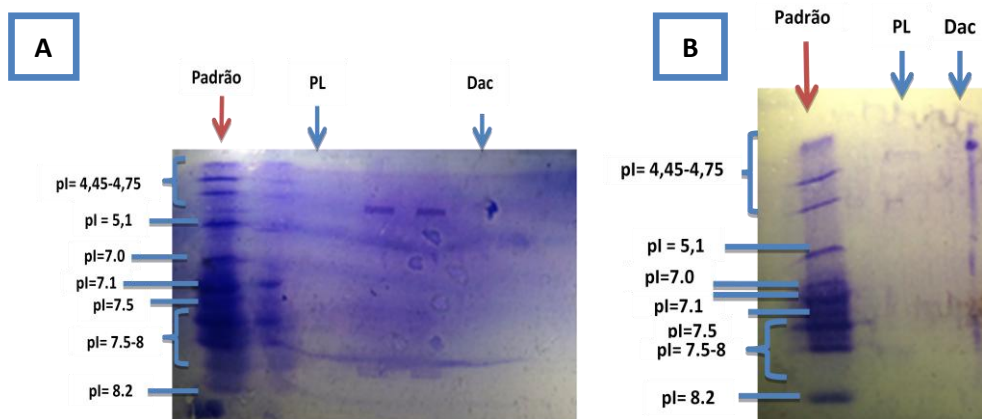


Figura 20: Eletroforetogramas obtidos após separação por IEF em géis de policrilamida (A e B) dos extratos de *Platanus hybrida* e *Dactylis glomerata*. A fotografia de cada gel contém o padrão, PL (*Platanus hybrida*) e Dac (*Dactylis glomerata*), conforme a legenda.

Pode observar-se que a separação originou diversas bandas características. O resultado da análise das diversas experiências encontra-se descrito na tabela 6.

Registaram-se, para o caso de *Platanus hybrida*, 9 bandas proteicas com pI no intervalo entre 8,30-4,38, sendo 4 bandas na zona ácida ($pI \leq 6$), duas na zona neutra (6,5-7,5) e restantes 3 na zona básica ($pI \geq 7,5$). No caso da *Dactylis glomerata*, foram identificadas também 9 bandas proteicas com pI no intervalo entre 8,20-4,00, apresentando, no entanto, 3 bandas na zona ácida ($pI \leq 6$), três na zona neutra (6,5-7,5) e 2 na zona básica ($pI \geq 7,5$).

Tabela 6: Valores de ponto isoelétrico calculados para as bandas proteicas detetadas na separação eléctroforética por IEF, para extratos de pólen da espécie de *Platanus hybrida* (n=3) e para a espécie *Dactylis glomerata* (n=3). Sempre que possível, estão representadas médias \pm desvios padrão (sd).

	Amostra de <i>Platanus hybrida</i>	Amostra de <i>Dactylis glomerata</i>
Banda	pI (média \pm sd)	pI (média \pm sd)
a	8,3 \pm 0,1	8,2
b	7,9	
c	7,7	7,7
d	7,1 \pm 0,1	7,2
e	6,8	6,9
f		6,5
g	6,0 \pm 0,0	5,7 \pm 0,2
h	5,1 \pm 0,2	5,1
i	4,6	
j	4,4 \pm 0,14	4,4 \pm 0,0
k		4,0 \pm 0,0

Comparando os perfis proteicos das duas espécies (figura 19 e tabela 6) pode observar-se que são maioritariamente sobreponíveis; mais de 70% das bandas observadas em *Platanus hybrida* têm pI equivalente a bandas observadas em *Dactylis glomerata* (c, d, e, g, h e j). As bandas b e i são específicas de pólen de *P.hybrida* enquanto as bandas f e k de *D.glomerata* não apresentam correspondência com *P.hybrida*.

5.2.2 Determinação do perfil proteico de acordo com a massa molecular – SDS-PAGE

As amostras, previamente preparadas, e o padrão, foram aplicadas no gel de SDS-PAGE para separação de proteínas de acordo com a massa (Figura 21). Não se registaram diferenças significativas entre os vários géis realizados.

A figura 21 mostra 1 exemplo de gel corado com azul de Coomassie, exemplificando o conjunto de bandas proteicas obtidas na separação.

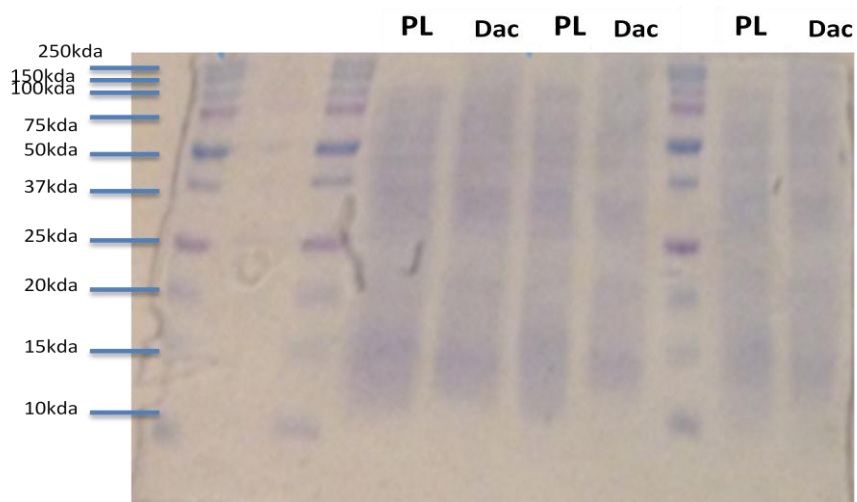


Figura 21: Perfil proteico do extrato de *Platanus hybrida* e de *Dactylis glomerata* em um gel, representativo de um total de 3 géis realizados. O padrão e os extratos de pólen de *Platanus hybrida* (PL) e de *D. glomerata* (Dac) foram aplicados no gel de acordo com o legendado.

A análise de todos os géis permitiu obter os resultados que estão resumidos na tabela 7.

No extrato de *Platanus hybrida* foram identificadas 10 bandas proteicas com massa molecular compreendidas entre 11-120 kDa e no extrato de *Dactylis glomerata* foram identificadas 14 bandas proteicas cujas massas moleculares se distribuíram no intervalo 10-140 kDa (Tabela 7).

Tabela 7: Valores de massas moleculares calculados para as bandas proteicas dos extratos de *Platanus hybrida* e de *Dactylis glomerata* após separação eletroforética por SDS-PAGE. Estão representadas médias \pm desvios padrão (sd). Resultados relativos a três experiências independentes.

	Amostra de <i>Platanus hybrida</i>	Amostra de <i>Dactylis glomerata</i>
Banda	MM (Média \pm sd)	MM (Média \pm sd)
A		143 \pm 9
B	121 \pm 2	
C		111 \pm 2
D	90 \pm 5	91 \pm 5
E		72 \pm 7
F	61 \pm 2	63 \pm 1
G		59 \pm 1
H	53 \pm 1	51 \pm 3
I	46 \pm 1	45 \pm 1
J	38 \pm 2	38 \pm 2
K	34 \pm 2	33 \pm 2
L	28 \pm 2	27 \pm 1
M		20 \pm 2
N	14 \pm 2	14 \pm 1
O	11 \pm 1	10 \pm 1

As duas espécies apresentam 9 bandas proteicas com massas semelhantes, sendo elas nomeadamente, D, F, H, I, J, K, L, N e O. Observou-se também que a banda B de massa aparente 120 kDa surge em *P. hybrida* e não no perfil proteico de *D. glomerata*.

Comparando com os alergénios descritos na literatura e identificadas em espécies análogas, observa-se que existem bandas cujas massas são semelhantes aos alergénios Pla a 1 (18 kDa), Pla a 2 (42 kDa), TLP (25 kDa) e Pla a 3 (10 kDa).

5.3 ESTUDO DO PERFIL ALERGOLÓGICO AO PÓLEN DE *PLATANUS HYBRIDA*

5.3.1 Estudo da sensibilização ao pólen de *Platanus hybrida*

Neste estudo recorreu-se a uma técnica de “Rast modificado” (ver materiais e métodos secção 4.1.6.1) para analisar a sensibilização de 10 soros a *P. hybrida* e *D. glomerata*.

A figura 22 mostra os resultados obtidos, onde representa a % de imunoreatividade em todos os soros testados, em duas experiências paralelas, uma para *P. hybrida* e outra para *D. glomerata*.

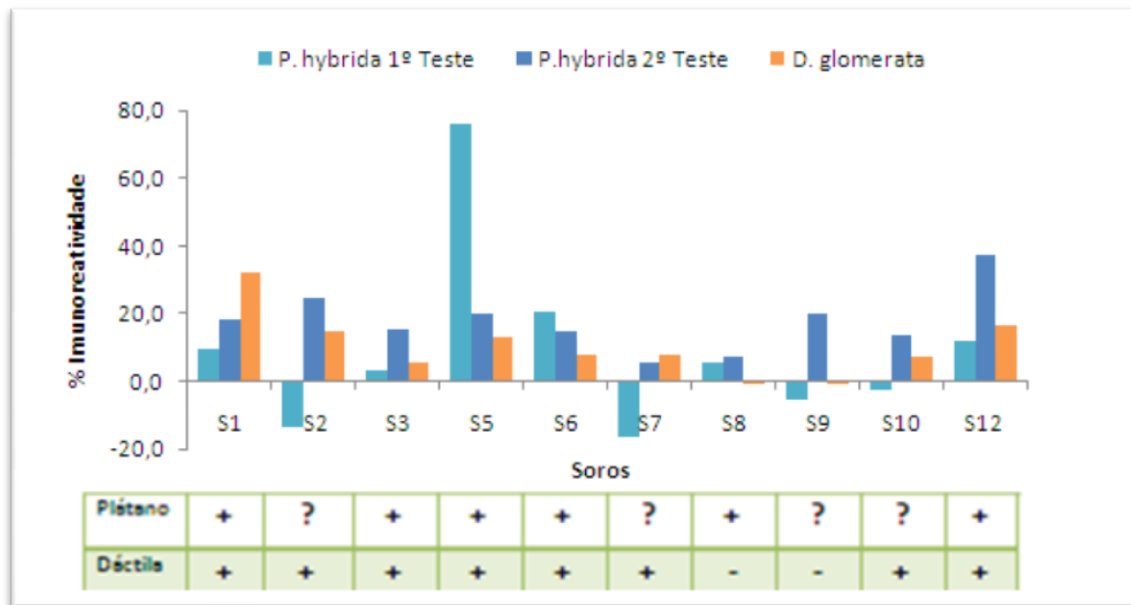


Figura 22: Imunoreatividade de cada um dos soros na presença de extrato de *Platanus hybrida* (n=2) e *Dactylis glomerata* (n=1). Resultados expressos em percentagem relativa há reatividade de cada um dos soros.

Pela observação e análise do gráfico, conclui-se que 6 dos 10 soros são imuno-reativos a *Platanus hybrida*. Os soros s2, s7, s9 e s10 exibiram resultados contraditórios, observando-se um resultado negativo no primeiro teste e um resultado positivo no segundo teste efetuado a *P.hybrida*. No caso de imuno-reatividade a pólen de *Dactylis glomerata*, observou-se que os soros s1, s2, s3, s5, s6, s7, s10 e s12 foram positivos, enquanto os soros s8 e s9 foram negativos.

Cerca de metade dos soros são, portanto, reativos e sensíveis a ambas as espécies em estudo (s1, s3, s5, s6 e s13). O soro s8 revelou-se reativo apenas ao pólen de *Platanus hybrida*, enquanto os soros s2 e s7 revelaram-se apenas sensíveis a *D.glomerata*.

Procedeu-se também à avaliação da existência de reatividade cruzada entre *P.hybrida* e *D.glomerata*. Para tal repetiu-se a experiência utilizando soros cujo teste anterior apresentou positividade para *D.glomerata*, tendo sido previamente inibidos com extrato de *D. glomerata* (ver sub-capítulo 4.1.6.1 do procedimento experimental).

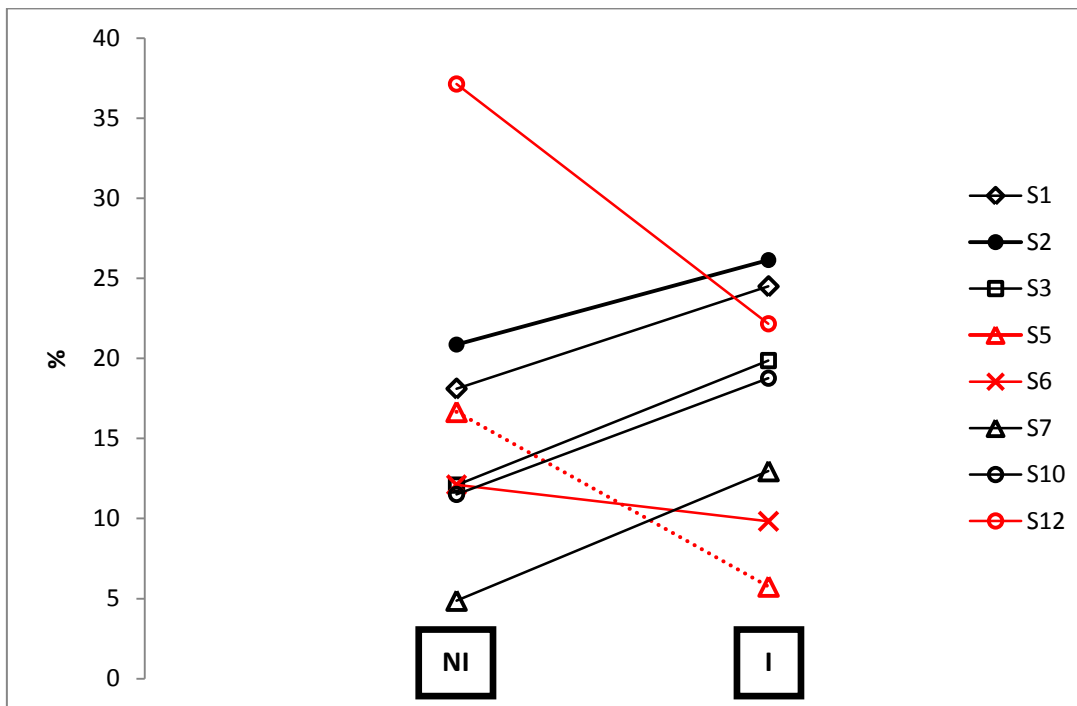


Figura 23: Representação da reação imunológica entre os soros não inibidos (NI) e inibidos (I) com extrato de *Dactylis glomerata*.

Os resultados obtidos estão resumidos na figura 23 e observou-se que existiu um decréscimo na reação imunológica dos soros s5, s6 e s12 a *P.hybrida*, após inibidos com extrato de *D.glomerata*, sugerindo assim a ocorrência de reatividade cruzada entre as duas espécies.

Estes resultados sugerem que os soros acima descritos, apresentam anticorpos IgE-específicos que reconhecem componentes equivalentes nos extratos de *P.hybrida* e *D.glomerata*. Esta possibilidade será devida à presença de alérgenos comuns a ambas as espécies e a IgE que possivelmente reconhecem epítomos análogos dos diferentes alérgenos de ambas. Note-se que no caso do soro s1, também positivo para ambas as espécies, que *D.glomerata* não impediu o reconhecimento de *P.hybrida*, sugerindo que o perfil de IgE específico para este soro é distinto, isto é, que os alérgenos reconhecidos são distintos nestas espécies.

5.4 ESTUDO DO PERFIL EM ALERGÉNIOS AO PÓLEN

Entre os soros testados e aqueles considerados reativos, selecionaram-se seis para serem estudados com mais detalhe e utilizados para a realização do método de western-blotting (ver tabela 8). Foram então testados o soro 1, que é positivo para plátano em ambos os testes realizados (ver figura 22) mas que não sofreu inibição (ver figura 23), os soros 5, 6 e 12, que foram positivos para plátano em ambos os testes realizados e em que a inibição foi positiva para *D.glomerata* e, por fim, os soros 7 e 10, em que os resultados nos testes realizados foram contraditórios mas que não sofreram inibição com extrato de *D.glomerata* (ver figura 23).

Tabela 8: Resumo dos resultados de reatividade cruzada, obtidos para os seis soros testados, entre *Platanus hybrida* e *Dactylis glomerata*.

Soros	<i>Platanus hybrida</i>	Inibição
S1	+	-
S5	+	+
S6		
S12		
S7	?	-
S10		

A figura 24 mostra os resultados obtidos para o perfil de bandas imunomarcadas de acordo com a massa molecular. Foram identificadas 6 bandas imunoreativas correspondentes a *Platanus hybrida* no intervalo de massas molares de 10 – 100 kDa e 5 bandas proteicas no extrato de *Dactylis glomerata* com massas molares compreendidas entre 10 - 150kDa (Tabela 13 e figura 24).

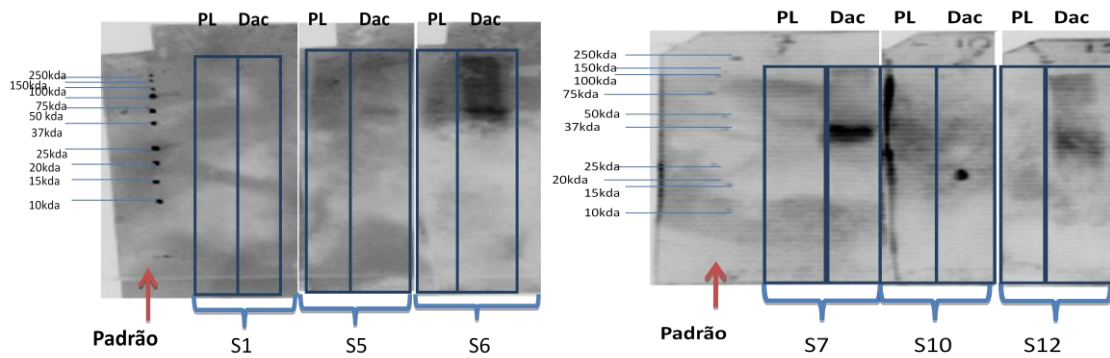


Figura 24. Representação de membranas de PDVF com imunoreatividade a proteínas de *Platanus hybrida* e *Dactylis glomerata* após separação electroforética por SDS-PAGE, electrotransferência e marcação imunológica com os soros 1, 5, 6, 7, 10 e 12.

As bandas imunoreativas encontradas em *P.hybrida* têm correspondência em termos de massa com algumas da identificadas no perfil proteico obtido por SDS-PAGE (ver subcapítulo 5.2.2 e tabela 7). Podemos então identificar e fazer a correspondência com a massa para as bandas F (75 kDa), H (50 kDa), J (39 kDa), L (28 kDa) e P (10 kDa) em extrato de *Platanus hybrida* enquanto em *D.glomerata* identificamos C (100kDa), D (92kDa), J (39 kDa) e P (10 kDa) (tabela 9). Note-se que as bandas J (38 kDa) e P (10 kDa) são comuns em ambos os extratos enquanto que as bandas H (50 kDa) e L (28 kDa) foram apenas reconhecidas em *P.hybrida*. É de notar que existe uma prevalência de sensibilização para a banda H, reconhecida por 3 indivíduos (S1, S7 e S10), para a banda J, reconhecida em 3 indivíduos (S1, S5 e S6) e por fim para a banda L, reconhecida novamente em 3 indivíduos (S1, S10 e S12).

É de notar que a banda J (39 kDa), poderá corresponder a um dos alergénios “major” descritos na literatura para *D.glomerata* (possivelmente Dac g 1 – 37 kDa (**ANEXO 1 – Tabela 13**)) [1]. Uma banda com massa equivalente foi também reconhecida pelos soros S5 e S6 no extrato de *P.hybrida*, sugerindo que os alergénios reconhecidos sejam homólogos nas duas espécies ou resultado de reatividade cruzada. Para o soro 7 não foi identificada qualquer banda, como mostra a figura 24 e a tabela 10, em concordância com o resultado negativo registado no “RAST modificado” (fig. 22). Note-se, no entanto, que foi reconhecida a banda J em *D.glomerata*, espécie para qual existiu um “RAST modificado” positivo (fig. 24 e tabela 9).

Tabela 9: Perfil alergológico do extrato de *Platanus hybrida* e *Dactylis glomerata* quanto à massa molecular.

	Extrato de <i>Platanus hybrida</i>						Extrato de <i>Dactylis glomerata</i>					
Banda (MM)	S1	S5	S6	S7	S10	S12	S1	S5	S6	S7	S10	S12
C												100
D									92			
F	75											
H	50			50	50							
J	37	37	39				39	39	37	39		37
L	28				28	28						
P						10				10		

No que respeita ao reconhecimento imunológico de proteínas nativas, estudado com base na separação em função do ponto isoelétrico, apresentam-se resultados na figura 25 e o resumo das diversas bandas imunoreativas encontra-se na tabela 10.

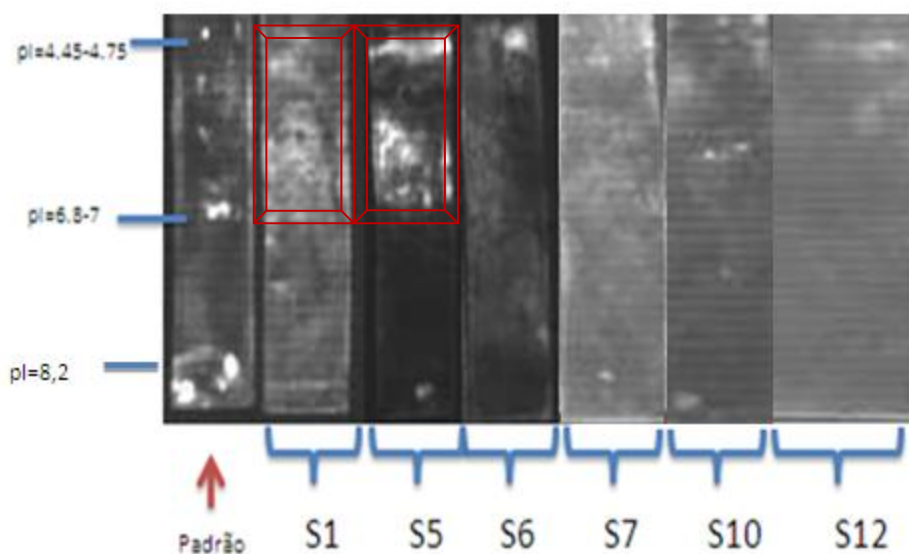


Figura 25: Imunoblot do extrato de *P. hybrida* após separação por focagem isoelétrica. A marcação imunológica foi realizada com os soros 1, 5, 6, 7, 10 e 12.

Pudemos observar (figura 25 e tabela 10) que o extrato de *Platanus hybrida* exibiu bandas imunoreativas no intervalo de pI 4.45-7. Observou-se uma banda com pI ácido no intervalo 4,45-4,75 para 5 dos 6 soros testados (s1, s5, s6, s10 e s12). Para o soro 7 não se observam quaisquer

bandas em concordância com os resultados anteriores. Quando comparados os soros positivos entre si, observou-se que o s1 e o s5 foram aqueles que apresentaram imunoreatividade para o maior número de bandas (ver tabela 10).

Tabela 10: Perfil alergológico correspondente ao extrato de *Platanus hybrida* referente ao pl. Representação e identificação de bandas de ambos os soros com referência à zona onde pertencem.

Banda	S1	S5	S6	S7	S10	S12
pH=4.45-4.75	+	+	+	-	+	+
pH=5.1	+	+	+	-	-	-
pH=6	+	+	-	-	-	-
pH=6.8-7	+	-	-	-	-	-

Tendo em conta o conjunto de resultados obtidos neste trabalho, podemos constatar que as bandas proteicas identificadas apresentam massas aparentes correspondentes a alergénios de uma espécie do mesmo género, *Platanus acerifolia*, já identificados na literatura, nomeadamente o **Pla a 2** (43 kDa), **Pla a 3** (10kDa), **Pla a 8** (15kDa) e **Pla TLP** (25kDa) [1]. Curiosamente não foram observadas quaisquer bandas com massa molecular aparente ou equivalente ao **Pla a 1** (18 kDa). Este resultado pode, contudo, dever-se à falta de sensibilidade do método de deteção. A utilização de um método mais sensível poderia ter permitido a identificação de mais bandas. Alternativamente, é ainda possível que o **Pla a 1** identificado em *Platanus acerifolia* não se expresse ou apresente massa diferente em *Platanus hybrida*. Existe, no entanto, uma banda de massa aparente aos 20 kDa identificada no perfil proteico e que não foi identificada em Western-blot.

Por outro lado, as bandas M (28) kDa) e H (50 kDa) reconhecidas exclusivamente em plátano, apresentam massas aparentemente próximas dos alergénios **Pla a 2** e **TLP** (ver tabela 2-secção 1.4.4).

Os resultados descritos, obtidos neste trabalho, apresentam coerência nas diferentes abordagens na medida em que os soros positivos a *Platanus hybrida* apresentaram um número elevado de bandas imunoreativas e aqueles que demonstram negatividade a este extrato não apresentam bandas. Para além disso, os resultados apontam também para a existência de reacção

cruzada entre plátano e gramíneas, aspeto que associado à exposição a este tipo polínico, poderá contribuir significativamente para o desenvolvimento de sintomatologia alérgica.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo procurou-se avaliar o perfil alergológico de *P.hybrida* da cidade de Évora através da avaliação da exposição a pólen de plátano, procurando-se caracterizar a distribuição desta planta no espaço urbano, bem como da avaliação da sensibilização a *P.hybrida* na população de Évora, caracterizada pela identificação de diversas bandas imunoreativas, evidenciando a existência de alergénios polínicos nesta espécie.

Foi identificada a presença de elevado número de plantas adultas em torno do centro histórico e em locais muito frequentados pela população, tais como Escolas e Hospitais. Por outro lado identificaram-se diversas bandas imunoreativas em extrato de pólen de *P. hybrida*, sugerindo a existência de sensibilização na população estudada. A comparação do perfil alergológico de pólen de *P. hybrida* e *D. glomerata* sugere sensibilização por reatividade cruzada (exemplo da banda de massa molecular 38 kDa) mas também a existência de alergénios possivelmente específicos (exemplo da banda de massa molecular 50 kDa e 28 kDa).

Estes resultados sugerem que o pólen de plátano, dada a sua grande abundância na cidade de Évora, poderá contribuir para o agravamento da sintomatologia da população que sofre de polinose, em particular no início da primavera.

O trabalho aqui apresentado reforça a importância da determinação do perfil alergológico das diferentes espécies locais e o esclarecimento de reatividade cruzada como um contributo para a compreensão da clínica no controlo da doença e conseqüentemente para a promoção e o bem-estar da população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, M.K., Yunginger, J.W., Swanson, M.C., and reed, C.E (1981). "An immunochemical method to measure atmospheric allergens". *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 68: 194-200.
- Asturias, J.A, Ibarrola, I.Bartolomé, B.Ojeda, I.Malet, A. and Martinez, A. (2002). "Purification and charaterizacion of Pla a 1, a major allergen from *Platanus acerifolia* pollen." *Allergy* (57):221-227.
- Asturias, J.A, Ibarrola, I, Eraso, E, Arilla, M.C., and Martinez, A. (2003). "The major *Platanus acerifolia* pollen allergen Pla a 1 has sequence homology to invertase inhibitors". *Clin Exp Allergy* 33 (7): 978-985.
- Amoresano, A. Pucci, P., Duro, G., Colombo, P., Costa, M.A., Izzo, V., Lamba, D. and Geraci, D. (2003) "Assignment of Disulfure bridges in Par J 2.0101, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen". *Biol.Chem.* (384): 1165-1172.
- Arilla, M.C, González-Rioja, R, Ibarrola, I., M.I.R, A., Monteseirin, J., Conde J. Martinez, A. and Asturias,J.A, (2006). "A sensitive monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay to quantify *Parietaria judaica* major allergens, Par j 1 and Par j 2". *Clin.Exp.Allergy* 36 (1): 87-93.
- Abbas, A. K., & Lichtman, A. H. (2005). "Imunologia Celular e Molecular" (capítulo 19) pp: 245-255.
- Abbas K. Abul, (2012). "Imunologia Celular e Molecular". 7 edição (capítulo 19): pp: 355-365.
- Bio-rad laboratories. (2014). "Mini-trans-blot Electrophoretic Transfer Cell". Retrieved from <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703930.pdf>.
- Bohle B., Y. M. K. H.-S. H. B. F. F., 2006. "Characterization of recombinant Mal d 4 and its application for component-resolved diagnosis of apple allergy". *Clinical and Experimental allergy* , 36: pp. 1087-1096.
- Brandão (2013) - Comunicação oral, power-point "Morfologia e estrutura polínica", pp: 38-45.
- Caeiro, E. (2004) – "Estudo Aeropalínológico 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. 164p.
- Caeiro^{1,2}, E., Irene Câmara Camacho³, Luísa Lopes⁴, Ângela Gaspar⁵, Ana Todo-Bom⁶, José Ferraz de Oliveira⁷, José Costa Trindade⁸, Rui Brandão^{2,9}, Carlos Nunes¹⁰, Mário Morais-Almeida⁵ (2014) "Análise das concentrações de pólen de gramíneas na atmosfera de Portugal Continental" *Revista portuguesa Imunoalergologia* volume 2.

- Fernández-González, M., Guedes, A., Abreu, I., and Rodríguez-Rajo, F. J. (2013). "Pl a_1 aeroallergen immunodetection related to the airborne Platanus pollen content". *Science of the Total Environment*, 463-464, 855–860.
- Galan C., Lopes L., Brandão R., Sánchez Mesa J.A (2005) "Correlation between pollen counts and symptoms in two different areas of the Iberian Peninsula: Cordoba (Spain) and Evora (Portugal)". Department of Plant Biology, University of Cordoba, Spain; Department of Biology, University of Evora, Portugal and Espirito Santo Hospital, Evora, Portugal. Vol. 15 (2): 112-116
- Garzía-Mozo, Mestre A, Galán C (2011) "Phenological trends in southern Spain. Comparative analysis of field and aerobiological data". Department Botany, Ecology and Plant Physiology. University Cordoba, Cordoba, Spain – 58.
- Galli, S. J., & Tsai, M. (2012). "IgE and mast cells in allergic disease". *Nature Medicine*, (18): 693–704.
- GE Healthcare Life Sciences. (2013). "Amersham calibration kits for pl determinations using isoelectric focusing", pp: 1–24.
- Garrido-Lestache & J.Subiza (2004) "Pólenes alergénicos en España" Volume 32, (3) – 121-124.
- Harry W. Schroeder, Jr, MD, PhD, and Lisa Cavacini, PhD (2010) "Struture and function of immunoglobulins" *American Academy of Allergy, Asmtha & Imunnology* S41-S52.
- Hamilton.G.Robert, PhD (2010) "Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity" *American academy of Allergy, asthma & Immunology* S285-S296.
- Ibarrola, I, M.Carmen Arilla, Alberto Martinez and Juan A. Asturias (2007) "Identificacion of a polygalacturonase as a major allergen (Pl a 2) from Platanus acerifolia pollen" Bilbao Spain 1185-1191
- Information, O. (2000). IEF Standards Instruction Manual Catalog Number 161-0310, (161).
- Jianan, X., Zhiyun, O., Hua, Z., Xiaoke, W., and Hong, M. (2007). Allergenic pollen plants and their influential factors in urban areas. *Acta Ecologica Sinica*, 27: 3820–3827.
- Jensen, J., Poulsen, L. K., Mygind, K., Weeke, E.R. and Weeke, B. (1989). "Immunochemical estimations of allergenic activities from outdoor aeroallergens, collected by a high-volume air sampler". *Allergy*. 44 (1):52-592
- Kindt, T., Osborne, B., & Goldsby, R.(2006). "Kuby Immunology" 6ª edição pp: 34-40

- Kelly D.Stone, MD, PhD, Calman Prussin, MD and Dean D.Metcalf, MD (2009) "IgE, mast cells, basophils, and eosinophils" American Academy of Allergy, Asthma & Immunology 573- 579.
- Pazouki, N., Sankian, M., Leung, P. T. Y., Nejad-Sattari, T., Khavari-Nejad, R.-A., and Varasteh, A.-R. (2009). "Identification of cyclophilin as a novel allergen from *Platanus orientalis* pollens by mass spectrometry". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, (107): 215–7.
- Pesonen, M., Kallio, M. J. T., Siimes, M. a., and Ranki, A. (2015). "Allergen Skin Prick Testing in Early Childhood: Reproducibility and Prediction of Allergic Symptoms into Early Adulthood". *The Journal of Pediatrics*, (166): 401–406.
- Plus, P., Unstained, P., Value, S., All, P., Standards, B., Protein, P. P., Stain, C. (n.d.). "Related Products for Electrophoresis Dual Color Standards Instruction Manual Precision Plus Protein standards are the latest generation of recombinant proteins", pp: 14–16.
- Rocha Afonso, M. L. (1841). "Platanus". *Flora Iberica*, (487): 1–3.
- Robert G. Hamilton (2010) "Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity" S284-S296.
- Rocha Estrada, A., Alvarado-Vázquez, M. A., Hernández-Piñero, J. L., De León-Alanís, D. D., and Guzmán-Lucio, M. A. (2013). "Diversidad polínica en la atmósfera del área metropolitana de Monterrey". *Revista Mexicana de Biodiversidad*, (84): 1063–1069.
- Spieksma, F.T M., Kramps. J. A., Linden, A.C., Nikkels, B.E.P.H., Plomp, A., Koerten, H.K and Dijkman, J.H. (1990). "Evidence of grass-pollen allergenic activity in the smaller micronic atmospheric aerosol fraction". *Clinical and Experimental Allergy* 20 (3):273-280.
- Suárez-Cervera, M, Asturias, J.A, Veja-Marray, A, Castells, T, López-Iglesias, C. Ibarrola, I, Arilla, M.C., Gabarayena, N. and Seoane-Camba J.A (2005) "The role of allergenic proteins Pla a 1 and Pla a 2 in the germination of *Platanus acerifolia* pollen grains". *Sexual Plant reproduction*. (18): 101-112
- Subiza, J., Jerez, M., Jimenez, A., Narganes, M. J., Cabrera, M., and Varela, S. (1993)." Clinical aspects of allergic disease Allergenic pollen and pollinosis in Madrid". pp: 53-60
- Subiza, J., Cabrera, M., Valdivieso, R., Subiza, J. L., Jerez, M., Jiménez, J. A., and Subiza, E. (1994). "Seasonal asthma caused by airborne *Platanus* pollen". *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 24(12):1123–1129.
- Sánchez, J (2012) "Estudio inmunológico de los principales aeroalérgenos de la atmosfera de Málaga. Relacion con el contenido polínico y con los parâmetros meteorológicos"Departamento de Biología vegetal facultad de ciências, pp: 59-61
- Shi Jin, Robert T. Kennedy (2015) "New developments in Western blot technology"; pp: 10-15

Todo-bom, A., Nunes, C., and Caeiro, E. (2006). "Tipos polínicos alergizantes em Portugal – Calendário de 2002-2004". Revista Portuguesa de Imunoalergologia, 14 (1): 41–49.

Utad, J. B. (n.d.). Ficha: Platanus hispanica, 1.

Varela, S., Subiza, J., Subiza, J. L., Rodríguez, R., García, B., Jerez, M., and Panzani, R. (1997). "Platanus pollen as an important cause of pollinosis". Journal of Allergy and Clinical Immunology, 100(61): pp: 748–754.

Varelo, A.L & Picado, C.V (2002). "Polinosis. In: Polinosis. Polen y Alergia". Laboratorios Menarini, S.A., Badalona Barcelona, Espanha. ". pp:17-21

Sites:

[1]www.allergome.com (**data de consulta** - 24-09-2015)

[2] www.rede portuguesa de aerobiologia (**data de consulta** - 01-09-2015)

[3] www.jardim botânico UTAD (**data de consulta** - 25-08-2015)

[4] www.flora-on.pt, (**data de consulta** - 20-08-2015)

[5] www.thermoscientific.com, (**data de consulta** - 28-09-2015)

[6] www.google.earth, (**data de consulta** - 8-09-2015)

[7] www.sigma-aldrich.com (**data de consulta** – 12-09-2015)

ANEXOS

ANEXOS I

- Método de Bradford- Cálculo da concentração de proteína :

Tabela 11: Valores médios e desvio padrão da concentração de proteína dos 2 extratos (*Platanus hybrida* e *Dactylis glomerata*) pelo método de Bradford.

Espécie	Média final	Sd final	[proteína] mg/mL
<i>Platanus hybrida</i>	449,4	22,6	0,5±0,03
<i>Dactylis glomerata</i>	458,09	33,3	0,5±0,03

- Alergénios mais relevantes de *Dactylis glomerata*:

Tabela 12: Alergénios mais relevantes de *Dactylis glomerata* e correspondentes características [1].

Alergénios	Massa molecular (MW)	Nome comum
Dac g 1	32	AgDg1, Dg1, Expansin, Grasses, Group 1
Dac g 3	14	Grasses, Group 3
Dac g 4	60	CCD-bearing Protein (XF), Grasses, Group 4
Dac g 5	26	Grasses, Group 5
Dac g 12	?	Profilina
Dac g 13	60	Grasses, Group 13, Poligalaturonase

ANEXO II

- Curvas de calibração do perfil proteico respetivo aos géis de pi:

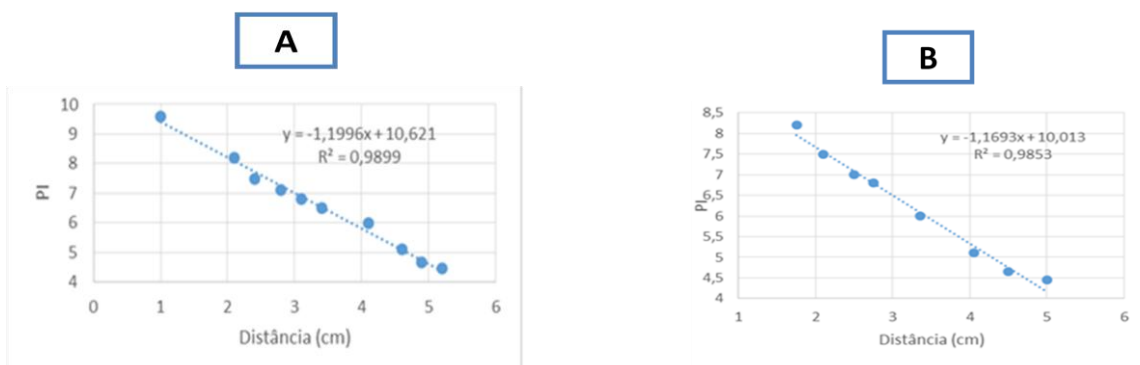


Figura 26: Curvas de calibração correspondentes aos géis A e B referente a pi ilustrados na figura 20.

- Curva de calibração do perfil proteico respetivo ao gel de SDS-PAGE:

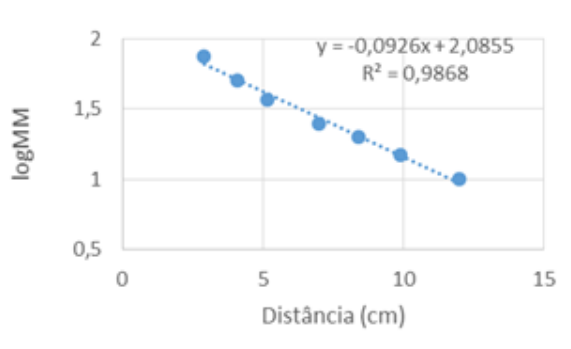


Figura 27: Gráfico da curva de calibração Distância VS Log MM correspondente aos gel representado na figura 21.

