



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

## **ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

### **Caracterização de padrões de reatividade cruzada de espécies alergologicamente relevantes no Alentejo, com gramíneas**

Isabel Margarida Bento Calhau

Orientação | Professora Doutora Célia Antunes

Professora Doutora Ana Rodrigues Costa

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2018





UNIVERSIDADE DE ÉVORA

## **ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

### **Caracterização de padrões de reatividade cruzada de espécies alergologicamente relevantes no Alentejo, com gramíneas**

Isabel Margarida Bento Calhau

Orientação | Professora Doutora Célia Antunes

Professora Doutora Ana Rodrigues Costa

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2018



# AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à Universidade de Évora, por ter sido o local onde me instituí e onde pude receber todo o meu conhecimento e experiência académica que um dia me irão definir. Quero agradecer também à Escola de Ciências e Tecnologia, nomeadamente Departamento de Química e Instituto das Ciências da Terra por terem financiado o projeto no qual está inserida esta dissertação.

Às minhas orientadoras, a Professora Doutora Célia Antunes e a Professora Doutora Ana Rodrigues por mais uma vês me darem a oportunidade de trabalhar com elas e por toda a ajuda, disponibilidade e conhecimento compartilhado.

Às minhas colegas de trabalho por, além do trabalho de equipa, serem companhias nos dias longos do trabalho de laboratório.

À minha família, pai, mãe, irmão e avó, por me terem incentivado a continuar a estudar e por terem sempre me apoiado ao longo dos últimos anos.

Ao Duarte Guerreiro por todo o seu amor, carinho e paciência nos últimos anos da minha vida, por ter estado ao meu lado nos bons e nos maus momentos e por nunca ter desistido de me incentivar a lutar pelos meus sonhos.

Por fim e não menos importante, agradeço aos meus amigos, Ana Teresa Rebocho, Ana Rita Casquinha e Vítor Almodôvar por, apesar da distância que nos separa, nunca se terem esquecido de mim e da nossa amizade.



# ÍNDICE

Agradecimentos .....	i
Índice .....	iii
Índice de Figuras .....	v
Índice de Tabelas .....	vi
Abreviaturas .....	vii
Unidades .....	viii
Resumo .....	ix
Abstract .....	x
1. Fundamentos Teóricos .....	1
1.1. A Alergia .....	1
1.1.1. Componentes do sistema imunitário envolvidos na hipersensibilidade do tipo I .....	2
1.1.2. Fases de desenvolvimento da reação alérgica .....	4
1.1.3. Alergénios .....	6
1.1.4. Reatividade cruzada .....	7
1.2. Alergia a pólen - Polinose .....	8
1.2.2. Alergénios polínicos .....	12
2. Problemática .....	20
3. Objetivos .....	21
3.1. Objetivo geral .....	21
3.2. Objetivos específicos .....	21
4. Metodologia .....	22
4.1. Estratégia .....	22
4.2. Procedimento Experimental .....	23
4.2.1. Caracterização da amostra e do estudo .....	23
4.2.2. Questionário para avaliação da prevalência de alergia a pólen na população em estudo .....	23
4.2.3. Colheita e processamento dos soros .....	23
4.2.4. Obtenção e preparação dos extratos de pólen .....	24
4.2.5. Quantificação da proteína .....	24
4.2.6. Enzyme Allergo Sorbent Test (EAST) .....	26
4.2.7. <i>Immunoblotting</i> .....	27
5. Resultados e Discussão .....	31
5.1. Caracterização da população em estudo .....	31
5.2. Avaliação da sensibilização a espécies relevantes na região .....	34

5.2.1. Validação do método EAST .....	34
5.2.2. Determinação da sensibilização às espécies em estudo .....	35
5.3. Identificação de bandas imunorreativas e avaliação de reatividade cruzada com <i>D. glomerata</i> .....	38
7. Referências .....	49
Anexos .....	55
Anexo 1: Questionário .....	55
Anexo 2: Soluções.....	56
Anexo 3: Equipamentos.....	58

# Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Estrutura da Imunoglobulina E .....	3
<b>Figura 2:</b> Mecanismo da inflamação alérgica: sumário da resposta inflamatória do desencadeamento inicial da sensibilização alérgica e inflamação alérgica após exposição subsequente a alérgenos inalados.....	5
<b>Figura 3:</b> Totais polínicos registados de março a junho nas 5 estações de monitorização durante 4 anos .....	9
<b>Figura 4:</b> Prevalência dos diferentes tipos polínicos dos anos de janeiro de 2017 a julho de 2018 de Évora.....	10
<b>Figura 5:</b> Calendário polínico do pólen de Cupressaceae, Poaceae, Quercus, Platanus e Oleae no ano de 2017 na região de Évora.....	10
<b>Figura 6:</b> Envolvimento dos alérgenos das gramíneas na sensibilização.....	13
<b>Figura 7:</b> Plátano.....	16
<b>Figura 8:</b> Azinheira.....	18
<b>Figura 9:</b> Reação química representativa da formação do complexo corado BCA com o $Cu^+$ .....	25
<b>Figura 10:</b> Exemplo de curva de calibração obtida através do método do BCA utilizando padrões de BSA.....	25
<b>Figura 11:</b> Histograma e caixa de bigodes dos grupos de indivíduos em estudo.....	32
<b>Figura 12:</b> Diagrama de Venn e caixa-de-bigodes: associação das três perguntas-chave do inquérito. ....	33
<b>Figura 13:</b> Estudo de correlação entre a IgE total e a IgE específica para as três espécies em estudo. ....	34
<b>Figura 14:</b> Determinação da sensibilização a <i>D.glomerata</i> , <i>Q. rotundifolia</i> e <i>P. hybrida</i> .....	35
<b>Figura 15:</b> Divisão da sensibilização das espécies nos dois grupos dos inquéritos.....	36
<b>Figura 16:</b> Indivíduos testados para as três espécies em estudo.....	37
<b>Figura 17:</b> Identificação de bandas imunorreativas dos diferentes soros testados para o extrato de <i>D. glomerata</i> .....	40
<b>Figura 18:</b> Identificação de bandas imunorreativas dos diferentes soros testados para o extrato de <i>P. hybrida</i> . .....	43
<b>Figura 19:</b> Identificação de bandas imunorreativas dos diferentes soros testados para o extrato de <i>Q.rotundifolia</i> .. ..	45

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Classificação de hipersensibilidade de Gell e Coombs .....	1
<b>Tabela 2:</b> Distribuição taxonómica das famílias de pólen alergizante e seus respectivos grupos de alergénios. 12	
<b>Tabela 3:</b> Grupos de alergénios de gramíneas identificados .....	15
<b>Tabela 4:</b> Alergénios caracterizados para a espécie <i>P. hybrida</i> .....	16
<b>Tabela 5:</b> Alergénios caracterizados para o género <i>Quercus</i> .....	18
<b>Tabela 6:</b> Reagentes e soluções para a preparação de géis de SDS-PAGE .....	28
<b>Tabela 7:</b> Indivíduos que responderam “Não” ou “Sim” às perguntas-chave.....	31
<b>Tabela 8:</b> Caracterização de bandas imunorreativas em extrato proteico de pólen de <i>D. glomerata</i> .....	38
<b>Tabela 9:</b> Percentagem de inibição das bandas imunorreativas para extrato de pólen de <i>D. glomerata</i> .. .....	41
<b>Tabela 10:</b> Caracterização de bandas imunorreativas em extrato proteico de pólen de <i>P. hybrida</i> .....	42
<b>Tabela 11:</b> Percentagem de inibição das bandas imunorreativas para extrato de pólen de <i>P. hybrida</i> .....	43
<b>Tabela 12:</b> Caracterização de bandas imunorreativas em extrato proteico de pólen de <i>Q. rotundifolia</i> .....	44
<b>Tabela 13:</b> Percentagem de inibição das bandas imunorreativas de <i>Q. rotundifolia</i> .....	45

# ABREVIATURAS

+	<b>APC</b>	Célula apresentadora de antígeno	Do inglês <i>Antigen-presenting cell</i>
+	<b>APS</b>	Persulfato de Amônio	Do inglês <i>Ammonium persulfate</i>
+	<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino	Do inglês <i>Bovine serum albumin</i>
+	<b>FcεRI</b>	Recetor de alta afinidade para a IgE	
+	<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitário Humano	Do inglês <i>Human leukocyte antigen</i>
+	<b>IgA</b>	Imunoglobulina A	
+	<b>IgD</b>	Imunoglobulina D	
+	<b>IgE</b>	Imunoglobulina E	
+	<b>IgG</b>	Imunoglobulina G	
+	<b>IgM</b>	Imunoglobulina M	
+	<b>IL-4</b>	Interleucina 4	
+	<b>IL-5</b>	Interleucina 5	
+	<b>IL-13</b>	Interleucina 13	
+	<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade	Do inglês <i>Major histocompatibility complex</i>
+	<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico	
+	<b>pI</b>	Ponto isoelétrico	
+	<b>PVDF</b>	Fluoreto de polivinilideno	Do inglês <i>Polyvinylidene difluoride</i>
+	<b>rpm</b>	Rotações por minuto	
+	<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio	Do inglês <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
+	<b>TEMED</b>	O <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilene-diamina	
+	<b>TLP</b>	Proteína tipo taumatina	Do inglês <i>Thaumatococcus-like protein</i>
+	<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano	
+	<b>TSLP</b>	Linfoetina estromal tímica	Do inglês <i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
+	<b>VCAM-1</b>	molécula de adesão celular vascular 1	Do inglês <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>

# UNIDADES

 (m/v)	massa/volume
 (v/v)	volume/volume
 °C	graus Celsius
 g	grama
 L	Litro
 m	metro
 g	Força gravitacional
 h	Hora
 M	Molar
 A	Ampere
 Da	Dalton
 V	Volt
 W	Watt

# RESUMO

## Caracterização de padrões de reatividade cruzada de espécies alergologicamente relevantes no Alentejo, com gramíneas

Os pólenes de plátano (*Platanus hybrida*) e azinheira (*Quercus rotundifolia*) são dos mais prevalentes no Alentejo, porém, desconhece-se o seu perfil alergológico. O objetivo deste trabalho consistiu em caracterizar a sensibilização de uma população de jovens universitários a pólen de gramíneas (*Dactylis glomerata*), azinheira e plátano e avaliar padrões de reatividade cruzada.

Aplicou-se uma escala para avaliar a prevalência de polinose. A sensibilização foi avaliada por EAST e o perfil em alergénios e reatividade cruzada por *Immunoblotting*. Os resultados sugerem que 36% dos indivíduos apresentam sintomatologia alérgica na estação polínica. Estes apresentaram sensibilização a pelos menos um tipo polínico, sendo a prevalência a gramíneas, azinheira e plátano ~45%, ~30% e ~29%, respetivamente. Registou-se reatividade cruzada de azinheira e de plátano com gramíneas.

Estes resultados sugerem que a sensibilização a azinheira e plátano pode contribuir para o agravamento dos sintomas registados no início da primavera nesta região.

# ABSTRACT

## Characterization of cross-reactivity patterns of allergologically relevant species in Alentejo, with grasses

Planetree (*Platanus hybrida*) and holm oak (*Quercus rotundifolia*) pollens are among the most prevalent in Alentejo, however their allergenic profiles are yet poorly characterized. The objective of this work was to characterize the sensitization of a university student population to grass (*Dactylis Glomerata*), holm oak and planetree pollen and evaluate their cross-reactivity patterns.

A scale was applied to evaluate the prevalence of pollinosis. Sensitization was assessed by EAST and the allergen profiles and cross-reactivity were analysed by Immunoblotting. The results suggest that 36% of the individuals presented allergic symptoms during the pollen season. This population was sensitized to at least one pollen type; sensitization prevalence to grasses, holm oak and planetree was ~45%, ~30% and ~29%, respectively. Holm oak and planetree have shown cross-reactivity with grasses.

These results suggest that sensitization to holm oak and planetree might contribute to worsen allergy clinical signs on the early spring in this region.

# 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

## 1.1. A Alergia

O termo “**alergia**” surgiu em 1906 descrevendo uma “reatividade específica alterada do organismo”. Hoje em dia define-se a alergia como uma hipersensibilidade imunológica que pode levar a uma variedade de diferentes patologias, com diferentes etiologias e, portanto, podem existir diferentes abordagens no diagnóstico, terapia e prevenção (Ring, 2014). A alergia não é pois, em si, uma patologia, mas sim um mecanismo que pode desencadear patologias.

A alergia consiste numa reação exagerada do sistema imunitário contra a uma substância, inofensiva para a população em geral, o alergénio. Os mecanismos imunológicos protetores podem muitas vezes causar efeitos prejudiciais ao hospedeiro. A exposição subsequente de um indivíduo sensibilizado ao mesmo alergénio conduz a uma resposta imunitária. Esta reação exagerada geralmente ocorre minutos após o contato com estes alergénios, tratando-se assim de uma reação de hipersensibilidade imediata ou de tipo I de acordo com a classificação de Gell e Coombs (**Tabela 1**). Na maior parte dos casos, esta reação resulta de uma produção aumentada da IgE que é específica para este alergénio. Existem casos em que a alergia também pode ser mediada por IgG, sendo esta reação menos frequente (Barata, 2007; O'Connor & Nichol, 2015; Ring, 2014).

As alergias podem ser vistas em quase todos os órgãos. No entanto, são a pele e as membranas mucosas que estão mais envolvidas, visto estas representarem a fronteira entre o indivíduo e o seu meio ambiente. A alergia muitas vezes começa nos primeiros três meses de vida e é muito raro aparecer ao nascimento, mesmo que exista uma forte origem genética. A alergia, em alguns casos, não persiste durante toda a vida; alguns indivíduos deixam de sofrer desta hipersensibilidade espontaneamente. Contudo, muitas das doenças alérgicas têm um curso crónico (Ring, 2014).

**Tabela 1:** Classificação de hipersensibilidade de Gell e Coombs [adaptado de (O'Connor & Nichol, 2015)]

<b>Tipo I</b>	<b>Imediata</b>	Mediada por IgE com libertação de histamina dos mastócitos e basófilos	Ex: anafilaxia, rinoconjuntivite alérgica
<b>Tipo II</b>	<b>Citotóxica</b>	Mediada por IgE ou IgM com fixação subsequente do complemento	Ex: anemia hemolítica induzida por drogas, Síndrome de Goodpasture
<b>Tipo III</b>	<b>Imunocomplexos</b>	Complexos anticorpo-antígeno depositados nas imediações das paredes vasculares	Ex: doença do soro, artrite reumatoide
<b>Tipo IV</b>	<b>Retardada</b>	Mediada por células T	Ex: Dermatite de contato por hera venenosa, rejeição crónica ao transplante

### 1.1.1. Componentes do sistema imunitário envolvidos na hipersensibilidade do tipo I

O sistema imunitário é composto por sistema inato e sistema adaptativo. A **imunidade inata** aumenta a proteção oferecida pelas barreiras anatómicas e fisiológicas e depende de um repertório limitado de receptores para detectar patógenos invasores (Turvey & Broide, 2010). Esta desempenha um papel central na ativação da resposta imunitária adquirida subsequente. A **imunidade adquirida** é capaz de reconhecer e eliminar seletivamente microrganismos e moléculas estranhas ao indivíduo, ou seja, antígenos (Kindt, Goldsby, & Osborne, 2007c). A característica da imunidade adquirida é o uso de receptores específicos a antígenos nos linfócitos T e B e utiliza duas respostas principais: a resposta humoral, mediada pelos linfócitos B, e a resposta celular, mediada pelos linfócitos T (Cota & Midwinter, 2015; Parkin, J. and Cohen, 2001).

A hipersensibilidade do tipo I, mediada por anticorpos do tipo IgE é uma reação do sistema imunitário adquirida e envolve tanto uma resposta humoral como uma resposta celular. As principais células envolvidas neste tipo de reação são as células apresentadoras de antígeno (APC), nomeadamente os linfócitos, os macrófagos e as células dendríticas, e os basófilos e os mastócitos. Os componentes moleculares também envolvidos na nesta reação, são a IgE, o receptor de alta afinidade (FcεRI) e algumas interleucinas.

#### Células envolvidas na hipersensibilidade do tipo I

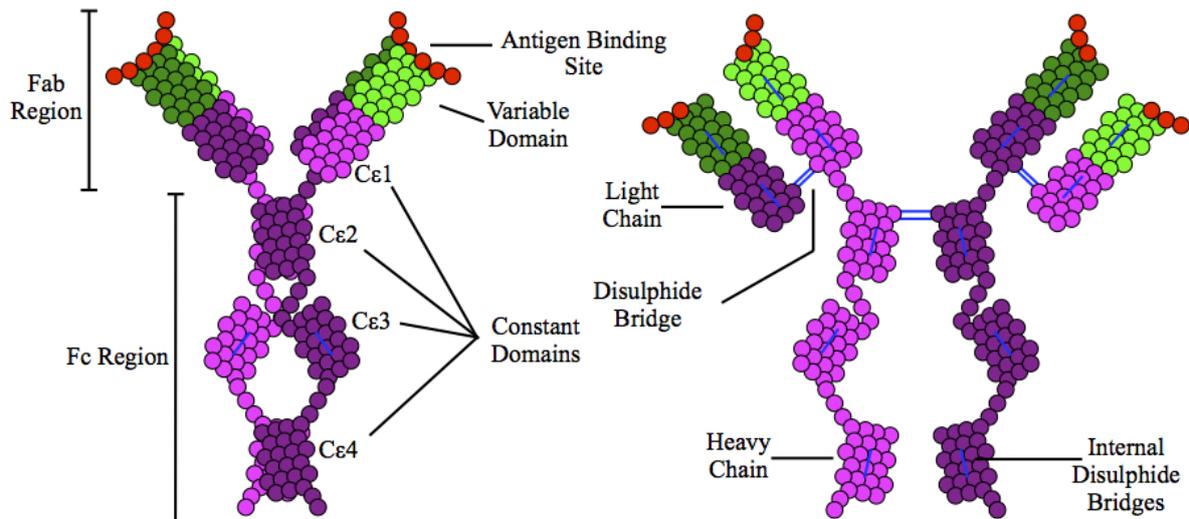
Os **linfócitos** ocupam um papel central no sistema imunológico, uma vez que conferem especificidade nas respostas imunológicas (Cardoso, 2007). Estes são as únicas células que produzem receptores distribuídos por clonagem específicos para diversos antígenos (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2016). Os linfócitos podem ser divididos em três populações maioritárias baseadas na função e nos componentes membranares da célula. Os linfócitos B e as células Th2 e Th17 são os que estão envolvidos na reação alérgica.

As **células apresentadoras de antígeno** (células B ativadas) envolvidas na hipersensibilidade do tipo I são os **macrófagos** e as **células dendríticas**. Os macrófagos são ativados por uma variedade de estímulos no curso de uma resposta imunitária (Kindt, Goldsby, & Osborne, 2007a). As células dendríticas são células especializadas em captar antígenos e estimular os linfócitos T (Cardoso, 2007).

Os **mastócitos e basófilos** têm uma importância semelhante nas reações alérgicas, pois possuem grânulos citoplasmáticos com histamina. Os mastócitos apenas povoam os tecidos. Ambos possuem os receptores de alta afinidade **FcεRI** (Cardoso, 2007; Kindt et al., 2007a).

## Componentes moleculares envolvidos na hipersensibilidade do tipo I

A **IgE** (**Figura 1**) é uma proteína plasmática vestigial no soro humano de indivíduos desparasitados e é a imunoglobulina com menor tempo de semivida. É a imunoglobulina associada a reações de hipersensibilidade, nomeadamente as reações alérgicas. A IgE liga-se com alta afinidade ao **receptor FcεRI**, expresso nos mastócitos, basófilos, células de Langerhans e eosinófilos (Schroeder et al., 2010; Turgeon, 2014).



**Figura 1:** Estrutura da Imunoglobulina E (retirado de wikipedia.org <sup>[1]</sup>)

As **interleucinas**, também referidas como citocinas, são segregadas por alguns leucócitos e também podem atuar em alguns deles. Já foram descobertas 29 interleucinas, sendo a IL-4, IL-5 e IL-13 as que participam na reação de hipersensibilidade do tipo I.

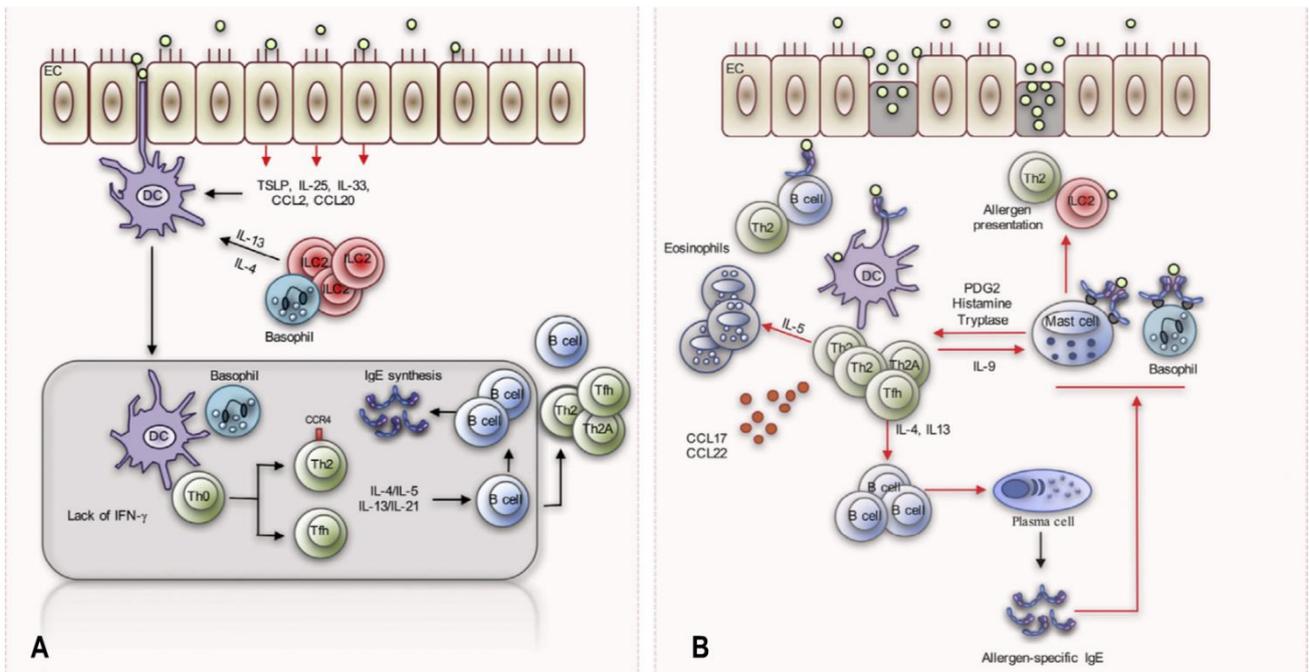
O **complexo major de histocompatibilidade de classe II** (MHC II) é constituído por glicoproteínas polimórficas encontradas nas membranas celulares. Este complexo é expresso pelos linfócitos B, pelos macrófagos e pelas células dendríticas (Arosa, 2007; Kindt, Goldsby, 2007b).

## 1.1.2. Fases de desenvolvimento da reação alérgica

Podem identificar-se duas fases distintas na reação alérgica: a fase de sensibilização e a fase efetora ou de contato secundário.

Na **fase de sensibilização (Figura 2A)** o antígeno, ao contatar a mucosa respiratória ou oral, vai ser endocitado por células apresentadoras de antígeno (APC), particularmente os macrófagos e as células dendríticas. Estas células têm a capacidade de migrar para os gânglios linfáticos drenantes e para zonas de tecido linfóide ligado às mucosas. Nos gânglios linfonodos, as APC vão apresentar os péptidos hidrolisados na via de apresentação antigénica endossómica, à superfície celular ligados ao MHC II. As células T CD4<sup>+</sup> (Th 2) com especificidade para esses péptidos vão reconhecê-los. Como resultado desta interação, estas vão ser ativadas, proliferar e iniciar a produção de citocinas, particularmente a IL-4 e a IL-13 (Barata, 2007). A IL-4 e a IL-13 induzem a mudança da classe das células B, para produção da cadeia pesada  $\epsilon$  da imunoglobulina e a consequente produção de anticorpos IgE alérgico-específicos (Akdis, 2014). As moléculas de IgE são libertadas para a circulação e ligam-se aos recetores de alta afinidade (Fc $\epsilon$ RI), que são expressos na membrana plasmática dos mastócitos e basófilos (Kindt, Goldsby, 2007a). A IL-5 promove a ativação e geração dos eosinófilos (Kindt, Goldsby, & Osborne, 2007b). Assim, com a produção de IgE específica e com o recrutamento de eosinófilos e linfócitos T, conclui-se a fase de sensibilização (Barata, 2007).

A **fase efetora (Figura 2B)**, ou de contato secundário, consiste no desenvolvimento de células de memória T e B e de funções efectoras relacionadas com a inflamação tecidual. Quando existe um novo contato com o alérgico, este causa uma ligação cruzada dos complexos IgE-Fc $\epsilon$ RI nos mastócitos e nos basófilos, pois já existe uma percentagem elevada de moléculas de IgE específicas na superfície dos mesmos e ocorre a ligação de duas ou mais moléculas de IgE adjacentes a determinantes antigénicos presentes nos alérgicos. Os mastócitos e os basófilos são posteriormente ativados, ocorrendo a sua desgranulação e, subseqüentemente, a libertação de mediadores anafilatógenos, responsáveis pela reação de hipersensibilidade imediata. De entre estes mediadores destacam-se a histamina, a triptase, derivados do ácido araquidónico e várias citocinas (Akdis, 2014; Barata, 2007). Os derivados do ácido araquidónico dentro da membrana lipídica incluem leucotrienos sulfidopeptídicos, fatores ativadores de plaquetas e prostaglandina D<sub>2</sub> (Shamji & Durham, 2017). Por outro lado as células B vão assumindo funções de apresentação antigénica a linfócitos T CD4<sup>+</sup>, nas quais os macrófagos e os monócitos conseguem fazer uma endocitose rápida de antígenos ligados à IgE (Barata, 2007).



**Figura 2:** Mecanismo da inflamação alérgica: sumário da resposta inflamatória do desencadeamento inicial da sensibilização alérgica e inflamação alérgica após exposição subsequente a alergénios inalados. **A**, fase de sensibilização; **B**, fase efetora (retirado de (Shamji & Durham, 2017)).

**Legenda da figura:**

**A** Lack of IFN- $\gamma$  (Falta de IFN- $\gamma$ ); IL (Interleucina), IgE synthesis (Síntese de IgE), Basophil (Basófilo), TSLP (Linfopoetina estromal tímica), CC (Quimiocina)

**B** Eosiniphils (Eosinófilo), Allergen presentation (apresentação do alergénio), Hystamine (Histamina), Tryptase (Triptase), Plasma cell (Célula plasmática), Allergen-specific IgE (IgE específica do alergénio)

### 1.1.3. Alergénios

Os **alergénios** são antigénios que são reconhecidos pelos anticorpos IgE específicos, podendo induzir sintomatologia alérgica. Eles podem ter origem biológica diversificada: animais, insetos, ácaros, plantas ou fungos. Os alergénios podem ser classificados como alergénios interiores ou exteriores. Os alergénios interiores são principalmente provenientes dos ácaros do pó doméstico e dos animais de estimação (pelo de gato e cão), baratas, bolores, plantas e roedores. Os alergénios exteriores são principalmente provenientes de plantas, fungos, bolores e leveduras (Baldacci et al., 2015).

Os alergénios que são transportados por via aérea são designados de aeroalergénios. A maior parte dos aeroalergénios deriva do pólen (Behrendt & Becker, 2001). Uma vez que as partículas tenham sido lançadas no ar, a sua concentração diminui com o aumento da distância do ponto de emissão. A dispersão das partículas é dependente do movimento de massa de ar, turbulência e convecção térmica, seguindo todas as leis físicas que se aplicam às partículas atmosféricas (Baldacci et al., 2015).

Os alergénios que desencadeiam as alergias por hipersensibilidade do tipo I são maioritariamente proteínas ou glicoproteínas e constituem menos de 2% de todas as famílias de proteínas conhecidas. Isto parece implicar que as similaridades moleculares entre as proteínas alergénicas e a comparação dos membros alergénicos e não alergénicos da mesma família de proteínas podem explicar o que determina a alergenidade.

A estrutura primária (sequência de aminoácidos) de uma proteína permite prever as suas propriedades físico-químicas, como o seu peso molecular, ponto isoelétrico, hidrofobicidade e estabilidade. Análises computacionais dos alergénios “*major*” mostraram que eles são relativamente pequenos (<70 kDa), possuem proteínas carregadas negativamente com baixa hidrofobicidade e alta estabilidade. Adicionalmente, as glicosilações, ou a presença de ligações dissulfureto, podem aumentar a estabilidade e a biodisponibilidade dos alergénios. Os progressos em biologia estrutural e bioinformática têm providenciado informação detalhada sobre as estruturas secundária e terciária de mais de 200 alergénios. A grande maioria dos alergénios podem ser agrupados em 4 famílias estruturais de acordo com o seu enrolamento. A estrutura quaternária de alergénios oligómeros influencia a alergenidade, por facilitar a ligação ao IgE-recetor, aumentando a estabilidade do alergénio e resultando na formação de epítomos adicionais. No entanto, mesmo com estas evidências, a alergenidade não pode ser determinada com base nos dados estruturais (Traidl-Hoffmann, Jakob, & Behrendt, 2009).

Um grande número de alergénios tem funções biológicas intrínsecas conhecidas. Eles atuam como proteases, pectato liases, inibidores de tripsina, proteínas ligadas a cálcio, etc. Algumas destas atividades podem contribuir para a alergenidade através da distribuição do alergénio no tecido por digestão da matriz extracelular, ou como proteínas ligantes da membrana por ligação à membrana fosfolipídica. A atividade enzimática também

pode condicionar a alergenicidade, através da mudança do microambiente em que os alérgenos são encontrados. Por fim os cofatores biogénicos e antropogénicos ambientais também podem contribuir para a sensibilização alérgica e a manifestação da doença (Traidl-Hoffmann et al., 2009).

A nomenclatura dos alérgenos segue as regras da IUIS (International Union of Immunological Societies) Allergen Nomenclature Subcommittee. As designações são feitas com base na taxonomia dos géneros e espécies dos quais os alérgenos são derivados: a designação compreende as três primeiras letras do género, uma única letra para a espécie, seguidas de um numeral árabe de acordo com a prioridade da descoberta e descrição, a menos que o alérgeno seja estruturalmente homólogo e possua uma reação cruzada imunologicamente com alérgenos previamente descritos de espécies diferente. Neste caso é atribuído mais um numeral <sup>[5]</sup>. Um exemplo desta nomenclatura será o alérgeno caracterizado da espécie *Phleum pratense*, o Phl p 1, onde Phl designa o género, p da espécie *pratense* e 1 por ter sido o primeiro a ser descrito para esta espécie. Por vezes são identificadas isoformas, sendo estas caracterizadas por um conjunto de 4 algarismos, como por exemplo o Phl p 1.0102 <sup>[5]</sup>.

Os alérgenos são ainda classificados como sendo “*major*” (frequência superior a 50%) ou “*minor*” (frequência inferior a 10%) com base na frequência com que eles são reconhecidos pela população alérgica à fonte biológica do mesmo (Behrendt & Becker, 2001).

#### **1.1.4. Reatividade cruzada**

As reações antígeno-anticorpo podem mostrar um alto nível de especificidade. A especificidade existe quando o local de ligação dos anticorpos, que estão direcionados a determinantes de um antígeno, não são complementares a determinantes de outros antígenos dissimilares. Quando alguns determinantes de um antígeno são partilhados por determinantes antigénicos similares na superfície de moléculas não relacionadas, uma proporção do anticorpo direcionado contra um tipo de antígeno também vai ligar-se a outro tipo de antígeno. Esta ligação tem o nome de reatividade cruzada. Por exemplo, anticorpos específicos de uma proteína de uma espécie também podem reagir com proteínas homólogas de outras espécies. Está comprovado que este fenómeno acontece entre bactérias que possuem a mesma parede celular polissacarídea, em alguns alérgenos alimentares e alérgenos presentes no pólen de vários tipos de plantas e árvores (Turgeon, 2014; Vieths, 1997).

No caso dos alérgenos provenientes do pólen, as expansinas, as profilinas e as proteínas ligantes de cálcio constituem as principais famílias de alérgenos polínicos. No caso da profilina, uma proteína transversal, é um panalérgeno muito estudado devido à sua homologia entre espécies de plantas diferentes, assim como outras fontes (Radauer & Breiteneder, 2006).

## 1.2. Alergia a pólen - Polinose

A alergia ao pólen, designada **polinose**, tem tido um impacto clínico notável em toda a Europa e têm existido evidências que sugerem que a prevalência das reações alérgicas respiratórias induzidas pelo pólen na Europa tem aumentado nas últimas décadas. No entanto, estudos feitos pela ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Children) mostraram a ausência desse aumento ou de pequenas mudanças na prevalência de sintomas de asma, rinoconjuntivites alérgicas e eczema nos centros europeus com a elevada existência da prevalência entre as crianças mais velhas (D'Amato et al., 2007). De acordo com o White Book on Allergy (WAO, 2011) a prevalência das alergias a pólen mundialmente pode ser até 30% (Thomas A. E. Platts-Mills, Bee Wah Lee & Chew, 2011).

Clinicamente, a polinose é caracterizada por rinoconjuntivite e/ou asma brônquica. Os indivíduos apresentam prurido ocular, com hiperemia conjuntival, coriza, espirros, prurido nasal ou faríngeo-palatino e obstrução nasal ou a falta dela. A hiper-reatividade brônquica associada à asma pode estar presente em 15 a 20% dos indivíduos. A hiperemia conjuntival e o prurido ocular estão quase sempre presentes na polinose, o que diferencia essa condição de uma constipação comum.

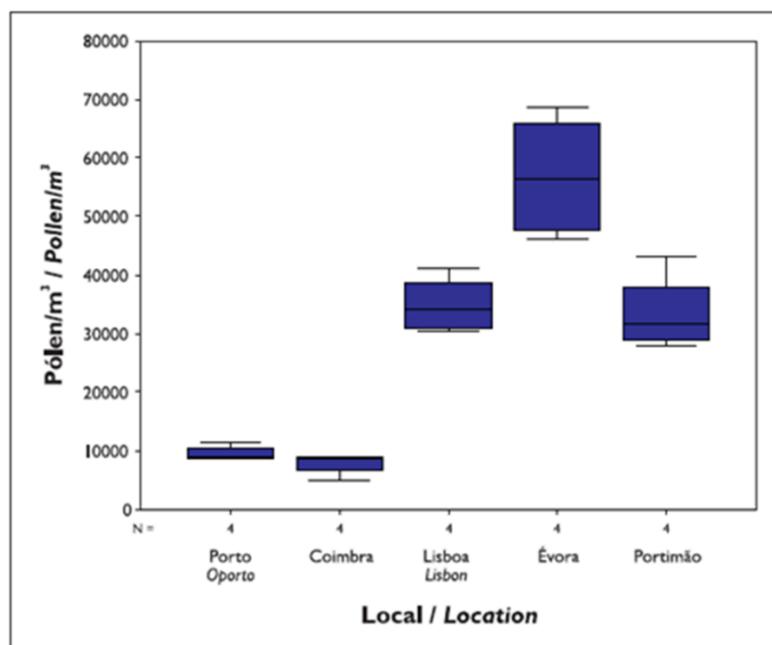
Uma característica importante da polinose é a sua periodicidade anual, com sintomas que ocorrem usualmente na mesma altura do ano, durante a polinização (Taketomi, Sopelete, Moreira, & Vieira, 2006).

Em Portugal, um estudo feito com inquéritos, com o objetivo de determinar a prevalência e caracterizar a rinite alérgica numa grande amostra populacional, concluiu que a prevalência da rinite foi de 26,1% e que este sintoma é mais prevalente no Alentejo e menos frequente no Algarve. A prevalência estimada de rinoconjuntivite foi 18,4%. Este sintoma pressupõe que grande parte destes indivíduos possa ter sensibilização a aeroalergénios (Morais-Almeida, Loureiro, Todo-bom, Nunes, & Pereira, 2005; ONDR, 2017).

## 1.2.1. Tipos polínicos associados à alergia

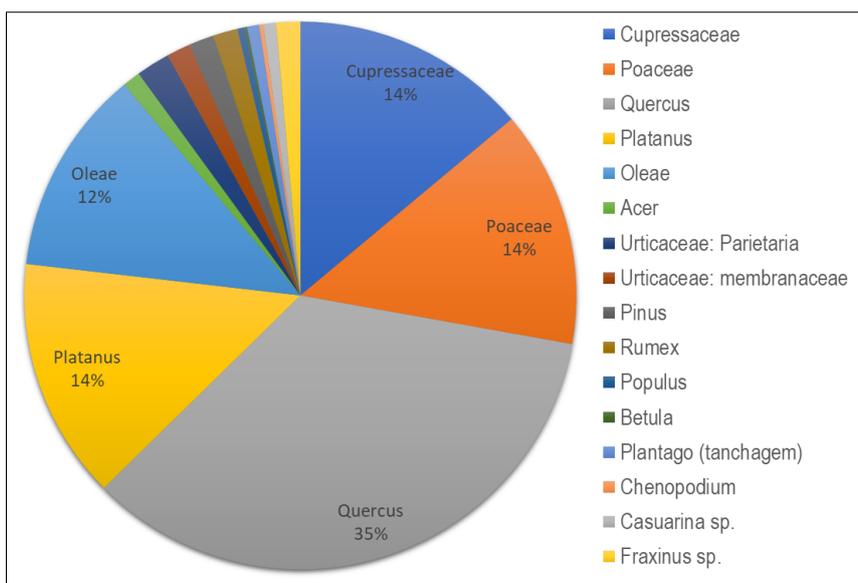
Na Europa as principais fontes alergénicas de pólen são as gramíneas, as árvores e as ervas. O pólen das gramíneas mais abundante no ar provem das espécies *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata* e *Alopecurus pratensis*. O pólen mais alergizante das árvores é produzido pela bétula (*Betula*), oliveira (*Olea europaea*) e cipreste (*Cupressus*) e a família das *Fagales* também tem demonstrado altos níveis de reatividade cruzada. Já *Parietaria* consite no maior género de urticáceas alergizantes (D'Amato et al., 2007).

A exposição a alergénios polínicos mostra uma grande variabilidade geográfica e climática na Europa (Buters, 2014) e em Portugal, tendo-se observado que as contagens polínicas mais elevadas registaram-se nas estações situadas a sul do país, de uma forma mais acentuada na cidade de Évora (**Figura 3**) (Caeiro et al., 2007).



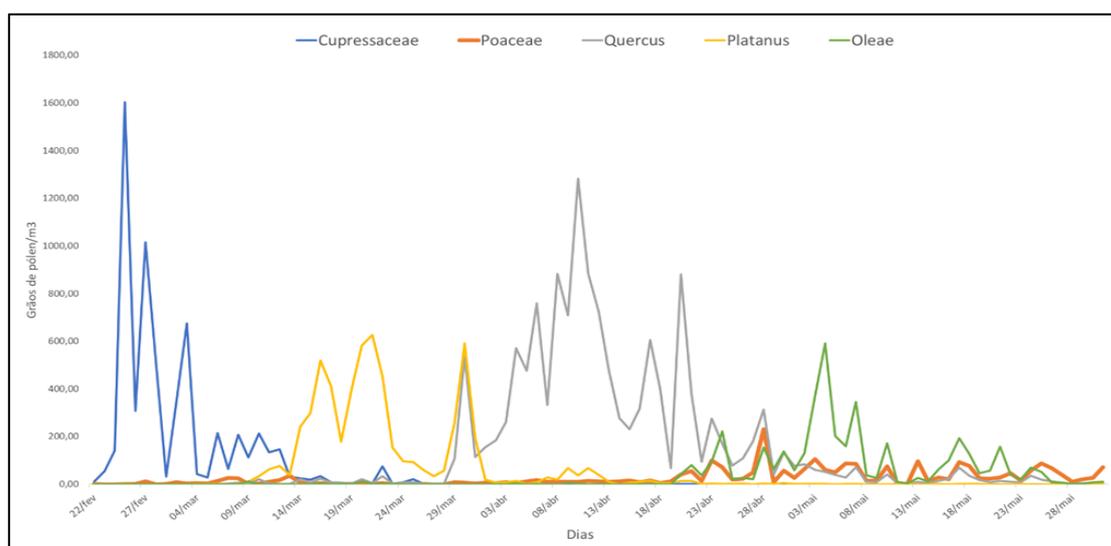
**Figura 3:** Totais polínicos registados de março a junho nas 5 estações de monitorização durante 4 anos (2003 a 2006); [retiradas de (Caeiro et al., 2007)].

Em Portugal já foram identificados 52 tipos polínicos diferentes (Caeiro et al., 2007), distribuídos em 16 tipos morfológicos diferentes. A **Figura 4** mostra a prevalência dos 16 tipos polínicos prevalentes no Alentejo. Pode observar-se que os tipos polínicos mais abundantes são de *Quercus*, *Platanus*, *Poaceae*, *Cupressaceae* e *Oleae*. (base de dados do ICT, <https://lince.di.uevora.pt/polen>).



**Figura 4:** Prevalência dos diferentes tipos polínicos dos anos de janeiro de 2017 a julho de 2018 de Évora (base de dados do ICT, <https://lince.di.uevora.pt/polen>).

A análise do perfil temporal destes tipos polínicos permite-nos determinar os períodos em que a espécie está a polinizar (época polínica) e os dias em que um determinado tipo polínico foi mais abundante (pico polínico). A figura 5 mostra o calendário polínico para os taxa alergologicamente mais relevantes; o pico polínico das *Cupressaceae* ocorreu a 25 de fevereiro, o de *Platanus* a 22 de março, o de *Quercus* a 11 de abril, o de *Oleae* a 5 de maio. O pólen de *Poaceae* foi detetável durante todo o período amostrado, sendo mais elevado a partir de 20 de abril.



**Figura 5:** Calendário polínico do pólen de *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Quercus*, *Platanus* e *Oleae* no ano de 2017 na região de Évora (dados da base de dados <https://lince.di.uevora.pt/polen>).

Segundo diversos estudos, a oliveira e as gramíneas são consideradas as fontes de pólen mais alergizantes nos países do Sul da Europa; O cipreste e o plátano são considerados moderadamente alergizantes e o género Quercus não está caracterizado do ponto de vista alergológico. No entanto, já existem alguns relatos de ter reatividade cruzada com outras espécies (Lopez, García de la Barrena, & Sastre, 2016). Em Portugal, o pólen de gramíneas foi detetado durante todo o ano, particularmente de março a junho [2]. As concentrações mais elevadas registaram-se nos meses de maio e junho em todo o país. Verificou-se também que a sul do país se registou um maior número de dias em que a concentração ultrapassou o seu valor limiar proposto (concentrações superiores a 25 grãos de pólen/m<sup>3</sup>; (Teno & Vilches, 2007)) a partir do qual se desencadeiam sintomas de alergia nos indivíduos sensíveis (Caeiro et al., 2014).

Em Évora, no ano de 2017 registaram-se 31 dias com concentrações polínicas superiores a 25 grãos de pólen/ m<sup>3</sup> e em 2018 registaram-se 55 dias (base de dados do ICT, <https://lince.di.uevora.pt/polen>).

## 1.2.2. Alergénios polínicos

De acordo com a literatura estão listadas 178 espécies de plantas que contêm pólen que provocou reações alérgicas. Estas plantas pertencem a 44 famílias taxonómicas de 29 ordens. Cerca de  $\frac{1}{4}$  do pólen alérgico pertence à família das gramíneas (Radauer & Breiteneder, 2006).

De acordo com a base de dados Allergome, os alergénios de pólen distribuem-se em apenas 29 famílias de proteínas.

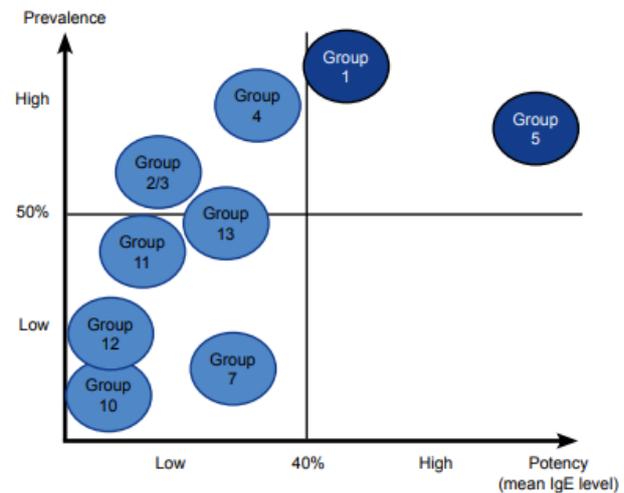
De acordo com a **Tabela 2** é possível verificar que existem 13 famílias de proteínas alérgicas identificadas de acordo com a sua função. A família *Poaceae* é a que contém mais alergénios, onde a maior parte faz parte das expansinas. As profilinas também estão presentes na maior parte das famílias de plantas cujo pólen contém alergénios (Radauer & Breiteneder, 2006).

**Tabela 2:** Distribuição taxonómica das famílias de pólen alergizante e seus respetivos grupos de alergénios (Radauer & Breiteneder, 2006).

Família	Total	Expansina C-terminal	Profilina	EF hand	Expansina N-terminal	Ole e 1	Pectase liase	Ribonuclease	Bet v 1	Glicohidrase	Ligante FAD	Taumatina	Prolamina	Amb V
<i>Cupressaceae</i>	20			1			7			3		6		
<i>Arecaceae</i>	1		1					8						
<i>Poaceae</i>	71	26	6	2	14	3	2			2	7			
<i>Asteraceae</i>	13		3										1	3
<i>Plantaginaceae</i>	1					1								
<i>Oleaceae</i>	12		1	3		4								
<i>Chenopodiaceae</i>	4		1	1		1								
<i>Brassicaceae</i>	8		2	4						1			1	
<i>Betulaceae</i>	13		2	3					5					
<i>Fagaceae</i>	3								3					
<i>Platanaceae</i>	2									1				
<i>Cannabaceae</i>	2		1											
<i>Urticaceae</i>	3		1										2	
<i>Euphorbiaceae</i>	2		2											

### 1.4.2.1. Alergênicos polínicos das gramíneas

O pólen das gramíneas consiste na principal causa de polinose em muitas partes do mundo. No entanto a sua frequência difere regionalmente; a polinose induzida pelas gramíneas é a alergia a pólen mais comum na Europa. Até 95% dos indivíduos alérgicos ao pólen de gramíneas possuem IgE específica para o grupo 1 de alergênicos e 80% para o grupo 5, sendo estes dois grupos os que constituem os alergênicos maioritários do pólen das gramíneas (**Figura 6**) (D'Amato et al., 2007).



**Figura 6:** Envolvimento dos alergênicos das gramíneas na sensibilização [retirado de (Kleine-Tebbe & Davies, 2014)].

No mediterrâneo o pólen de gramíneas consiste na causa mais importante de polinose. Entre 8 a 35% dos jovens adultos em países europeus mostram anticorpos IgE específicos para gramíneas.

Quanto à *Dactylis glomerata*, a gramínea utilizada neste estudo, estão descritos 8 alergênicos desta espécie, designados entre Dac g 1 e Dac g 13 (**Tabela 3**). O Dac g 1, um alergénio do grupo 1 das gramíneas, é uma  $\beta$ -expansina e foi reconhecido pelos anticorpos IgE em 95% dos indivíduos sensibilizados ao pólen de dactila (Mecheri, Peltre, & David, 1985). Este alergénio é homólogo ao Lol p 1, um alergénio também pertencente ao grupo 1 das gramíneas. O Dac g 2, cuja função biológica é desconhecida, é reconhecido pelos anticorpos IgE de 33% dos soros selecionados aleatoriamente, de indivíduos sensibilizados a gramíneas e em 67% de soros de indivíduos que recebiam imunoterapia a pólen de gramíneas (Roberts, Van Ree, Cardy, Bevan, & Walker, 1992). Estudos com o Dac g 3, um alergénio com função biológica também desconhecida, feitos por Guérin-Marchand e Sénéchal também mostraram a existência de IgE específica para este alergénio em mais de 60% dos soros de indivíduos sensibilizados a dactila (Guérin-Marchand & Sénéchal, 1996). Com o alergénio Dac g 4, uma oxidoreductase, verificou-se que 23 de 26 amostras plasmáticas mostraram ligação a este alergénio (Batard et al., 1993). O Dac g 5, um alergénio reconhecido como ribonuclease, em que 80% dos indivíduos alérgicos a pólen de dactila possuem IgE específica a este alergénio (D'Amato et al., 2007). Foi identificado quer em estudos de ligação da IgE a este alergénio purificado, quer por immunoblot, utilizando pools de soros de indivíduos sensibilizados a gramíneas (Klysner, Welinder, Løwenstein, & Matthiesen, 1992). Quanto ao grupo 6 das gramíneas, este não se expressa nesta espécie. Já o Dac g 7, identificado como uma polcalcina, não existem

ainda referências para a sua alergenicidade. O grupo 12 dos alergénios das gramíneas são profilinas, proteínas altamente conservadas e são encontradas por todo o reino das plantas (Lorenz, Lüttkopf, May, Scheurer, & Vieths, 2008), sendo por isso panalergénios. O grupo 13 representa um importante grupo de alergénios das gramíneas. Ele é constituído por glicoproteínas com uma sequência homóloga às poligalacturonases, uma família de enzimas que degrada pectinas (Grote, Swoboda, Valenta, & Reichelt, 2005). De acordo com Swoboda I. e colaboradores, estes sugerem que existe reatividade cruzada no grupo 13 das gramíneas apenas entre elas e não ocorre entre outras exo- e endopoligalacturonases. Com isto considera-se que o rPhl p 13 pode ser considerado como um marcador alérgico de diagnóstico para a sensibilização a pólen de gramíneas genuína (Petersen et al., 2001).

Existem até agora 13 grupos de alergénios identificados para as gramíneas

**Tabela 3:** Grupos de alergénios de gramíneas identificados (adaptado de (Kleine-Tebbe & Davies, 2014) e allergome.org [5])

Grupo alergénico	Função Bioquímica	Peso molecular (kDa)	Características	Exemplos
1	B-expansina	27 – 35	Glicoproteína, alergénio polínico <i>major</i> produzido por todas as espécies de gramíneas	Dac g 1; Phl p 1; Lol p 1
2	Desconhecida	11	Altamente homólogos ao grupo 3 e à porção terminal C do grupo 1 de alergénios	Dac g 2; Phl p 2; Lol p 2
3	Desconhecida	11 - 14	Altamente homólogos ao grupo 2 e à porção terminal C do grupo 1 de alergénios	Dac g 3; Phl p 3; Lol p 3
4	Oxidoredutases	50 - 60	Glicoproteína, membro da família de enzimas <i>Berberine Bridge</i> , sistema de resposta a patogénicos nas plantas	Dac g 4; Phl p 4; Lol p 4
5	Ribonucleases	27 - 35	Encontrado nas espécies Pooideae, associado a partículas de amido citoplasmático submicrónico	Dac g 5; Phl p 5; Lol p 5
6	Desconhecida	12 - 13	Homólogo a sequências internas do grupo 5, apenas em <i>Anthoxanthum odoratum</i> , <i>Phleum pratense</i> e <i>Poa pratensis</i>	Phl p 6
7	Polcalcina, proteínas ligantes de cálcio	8 - 12	Panalergénio, conjunto de dímero no pólen de gramíneas	Dac g 7; Phl p 7; Lol p 7
11	Proteína relacionada com Ole e 1 (Ole e 1-related protein)	16 - 20	Glicoproteína, estrutura similar aos alergénios do pólen de <i>Olea</i> (Ole e 1) e <i>Chenopodium album</i> (Che a 1)	Phl p 11; Lol p 11
12	Profilina	13 - 14	Panalergénio, altamente conservado	Dac g 12; Phl p 12; Lol p 12
13	Poligalacturonase	45 - 60	Glicoproteína, suscetível a degradação da protease	Dac g 13; Lol p 13; Phl p 13

### 1.4.2.2. Alergénios polínicos de *P. hybrida* (Plátano)

*Platanus hybrida*, um plátano híbrido entre *Platanus occidentalis* e *Platanus orientalis*, é muito encontrado na Europa Ocidental, particularmente em cidades onde o usam ornamentalmente. O plátano apresenta polinização anemófila, ou seja, ocorre pelo vento e produz uma grande quantidade de pólen entre os meses de março e maio [2].



Figura 7: Plátano (retirado de jb.utad.pt [4])

A sua relevância na alergia sazonal ainda é incerta, pois a maior parte dos artigos publicados que referem as principais fontes de pólen alergizante não mencionam este tipo polínico. No entanto, estudos efetuados na Península Ibérica referem uma percentagem de sensibilização da população entre 52 a 56% (Alcázar et al., 2004).

Já estão descritos alguns alergénios de pólen de plátano estando essa informação sistematizada na **Tabela 4**.

**Tabela 4:** Alergénios caracterizados para a espécie *P. hybrida* (retirado de allergome.org [5] e allergen.org [3]).

Alergénio	MM (kDaA)	Nome comum / Função Biológica	Reatividade cruzada
Pla a 1	18	Inibidor da invertase	
Pla a 2	43	Poligalacturonase	
Pla a 3	10	Proteína transferidora de lípidos	
Pla a 8	15	Profilina	Che a 2 Ole e 2
Pla a TLP	25	Taumatina	

Existem vários estudos de alergenicidade que envolveram os alergénios já identificados molecularmente do plátano, estando descritas situações de monossensibilização a plátano e também de polissensibilização.

Em Itália, um indivíduo de 40 anos que reportou rinoconjuntivites entre abril e maio mostrou reatividade ao pólen de plátano, mais especificamente ao Pla a 1 e Pla a 2 e a todos os outros alergénios testados mostrou negatividade, indicando uma provável monossensibilização a plátano (Asero, Mistrello, Amato, & Villalta, 2012).

De acordo com Asturias e colaboradores, foi demonstrado que 87% de 30 indivíduos alérgicos ao plátano apresentavam ligação da IgE ao Pla a 1 e 83% de 30 indivíduos alérgicos ao pólen do plátano mostraram ligação a uma proteína de 43 kDa de extrato de *Platanus acerifolia*, o Pla a 2 (Asturias et al., 2002). Já de acordo com Lauer e colaboradores, para o Pla a 3, apenas 45% de 58 indivíduos alérgicos a plátano mostraram ligação de IgE a este alergénio (Lauer et al., 2007).

De acordo com Barderas e colaboradores, estes mostraram reatividade cruzada do pólen de plátano com a profilina do pólen de *Chenopodium album*. Estes resultados também evidenciaram a alergenicidade das profilinas e o seu realce na reatividade-cruzada (Barderas, Villalba, & Rodríguez, 2004). A família da taumatina já foi identificada como um alergénio muito importante no pêssego e também já foi descrita noutros frutos e pólenes de outras espécies. Pensa-se que esta família seja um panalergénio responsável por a reatividade cruzada entre o pólen e o fruto, mas ainda não existem evidências experimentais suficientes. Esta proteína foi purificada do pólen de *P. acerifolia*, evidenciado assim a existência de outro alergénio de plátano, o Pla a TLP (Palacín et al., 2012).

Num estudo de Costa AR e colaboradores, realizado em nove doentes de polinose da região do Alentejo, com sintomatologia no início da primavera, todos eles apresentaram polissensibilização e sensibilização a pólen de plátano. Foi ainda possível identificar, por immunoblot, reatividade a Pla a 1 em todos os soros testados, e Pla TLP em oito dos nove soros testados. Este estudo mostrou ainda que alguma da reatividade a proteínas de plátano pode resultar de reactividade cruzada com alergénios de gramíneas, demonstrada em seis dos nove indivíduos (Costa et al., 2016).

#### **1.4.2.3. Alergénios polínicos de *Q. rotundifolia* (Azinheira)**

*Quercus rotundifolia*, de nome vulgar azinheira, é uma árvore folhosa, angiospérmica e dicotiledónea. Quanto à sua distribuição geográfica, a azinheira existe no Sul da Europa, existindo em todo o nosso país, espontaneamente, semeada ou plantada, adquirindo uma maior importância no interior alentejano (citado de naturlink.pt <sup>[5]</sup>). A polinização desta espécie ocorre pelo vento no período de março a julho <sup>[2]</sup>. O pico polínico do pólen de azinheira na região de Évora ocorre, habitualmente em abril, de forma consistente em cada ano, cerca de 1 mês antes do pico polínico das gramíneas (Caeiro, 2013).

Já existem alguns relatos sobre a sensibilização de indivíduos a esta espécie. M. Prados, em 1995, evidenciou que de 27 indivíduos com teste PRICK positivo a *Q. ilex*, 9 eram monossensibilizados a esta espécie (Prados, Aragon, Carranco, Martinez, & Martinez, 1995). Em 2016, um estudo de Antunes e colaboradores com pacientes com polinose da região do Alentejo apresentando sintomatologia no início da primavera revelou sensibilização da *Q. rotundifolia* em todos os indivíduos testados, todos polissensibilizados a outras espécies; este trabalho evidenciou ainda a potencial reatividade cruzada entre o pólen de azinheira e gramíneas, bem como com oliveira (Antunes et al., 2016).



Figura 8: Azinheira (retirado de flora-on.pt [6])

Apesar de não existirem alergénios identificados para esta espécie, estão documentados noutros tipos polínicos do género *Quercus*, apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Alergénios caracterizados para o género *Quercus* (retirado de allergome.org [5] e allergen.org [3]).

Espécie	Alergénio	MM (kDaA)	Nome comum / Função Biológica	Reatividade cruzada
<i>Quercus alba</i>	Que a 1	17	Proteína PR	Aln g 1 Bet v 1 Car b 1
	Que a 2	14	Profilina	Aln g 2 Bet v 2 Car b 2
	Que a 4	9	Proteína ligante de cálcio	Aln g 4 Bet v 4 Car b 4
<i>Quercus rubra</i>	Que ru 1		Proteína PR	
<i>Quercus suber</i>	Que su 1		Proteína PR	
	Que su 2		Profilina	

Há algumas descrições relativas a sensibilização a alergénios do género *Quercus*. De acordo com Niederberger e colaboradores, 7 de 10 soros de indivíduos sensibilizados a pólen de árvores mostraram ligação da IgE a Que a 1 e esta ligação foi inibida pelo alergénio da bétula Bet v 1. (Niederberger et al., 1998). De acordo com Lorenz A.R., este sugere que *Q. alba*, de ordem *Fagales*, pertence ao grupo taxonómico da bétula, sugerindo homologia dos alergénios, entre as espécies. De acordo com Egger e colaboradores, estes também verificaram a existência de reatividade cruzada entre o pólen de *Q. alba* com os alergénios Bet v 1, Bet v 2 e Bet v 4 e com o Phl p 4, sugerindo co-sensibilização entre espécies de árvores com gramíneas. Neste estudo também evidenciaram a presença de mais dois alergénios, além do Que a 1 para esta espécie, o Que a 2 e o Que a 4 (Egger et al., 2008).

No entanto, existem poucos estudos para o género *Quercus* e não existem alergénios caracterizados para a espécie *Q. rotundifolia*, a mais abundante em Portugal, mais particularmente na região de Évora, sendo assim de grande interesse o estudo de sensibilização desta espécie.

## 2. PROBLEMÁTICA

A prevalência das alergias respiratórias tem vindo a aumentar nos últimos tempos e por isso consiste num dos principais problemas de saúde pública.

O pólen de Oliveira e das Gramíneas constituem a principal causa das alergias respiratórias no Alentejo. Contudo, a população alérgica a estas espécies muitas vezes começa a ter sintomas de alergia respiratória antes da época polínica destas espécies. A azinheira (*Quercus rotundifolia*) e o plátano (*Platanus hybrida*) são espécies muito abundantes na região que libertam grandes quantidades de pólen. As suas épocas polínicas ocorrem antes da época polínica das gramíneas e da oliveira, e coincide com as queixas reportadas pelos indivíduos alérgicos. Sendo assim é importante saber se estes sintomas são responsáveis por reatividade específica a estas espécies ou se trata de reatividade cruzada com as gramíneas (Antunes et al., 2016; Costa et al., 2016).

Assim, este trabalho experimental teve como objetivo efetuar um estudo com vista à caracterização de padrões de reatividade cruzada da azinheira e do plátano com gramíneas. Para tal utilizou-se o pólen de *D. glomerata* como representativo das gramíneas por ser uma das mais abundantes na região e também por se encontrar entre as mais alergizantes da região.

Neste trabalho foram utilizadas técnicas imunológicas, o EAST para determinar a sensibilização de uma população jovem universitária às espécies em estudo e o *Immunoblotting* para caracterizar a reatividade cruzada e identificar bandas proteicas imunorreativas. Ambas as técnicas utilizaram soros de indivíduos e um extrato proteico de pólen das três espécies em estudo.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo geral

Neste trabalho experimental pretendeu-se caracterizar padrões de reatividade cruzada, com gramíneas, de espécies potencialmente relevantes do ponto de vista alergológico no Alentejo.

### 3.2. Objetivos específicos

- I. Identificação de alergénios para *D. glomerata*, *Q. rotundifolia* e *P. hybrida*
  - a. Identificação de indivíduos com sensibilização de entre uma população de voluntários (aplicação da escala, da IgE específica a pólen de *D. glomerata*, *Q. rotundifolia* e *P. hybrida*, recorrendo ao método EAST)
  - b. Identificação de bandas imunorreativas nas três espécies polínicas
- II. Caracterização do padrão de reatividade cruzada de *Q. rotundifolia* e *P. hybrida*, com gramíneas por comparação *Immunoblotting* e *Immunoblotting inibido*

# 4. METODOLOGIA

## 4.1. Estratégia

### Local de realização

✚ Laboratório A, Fase III do Colégio Luís António Verney, Universidade de Évora

### Duração

✚ 1 ano letivo

### Material Biológico

- ✚ Soro de humanos
- ✚ Extrato aquoso de pólen de *P. hybrida*
- ✚ Extrato aquoso de pólen de *Q. rotundifolia*
- ✚ Extrato aquoso de pólen de *D. glomerata*

### Técnicas utilizadas

- ✚ Espectrometria de Absorção Molecular
- ✚ Centrifugação
- ✚ Liofilização
- ✚ Enzyme Allergosorbent Test
- ✚ SDS-PAGE
- ✚ *Immunoblotting*

## **4.2. Procedimento Experimental**

### **4.2.1. Caracterização da amostra e do estudo**

Este estudo insere-se no âmbito do projeto “Estudos de sensibilização na população de Évora com doença alérgica respiratória”, com aprovação GD/44721/2015/P1 e autorização 15039 pela Comissão de Ética da Universidade de Évora. A amostra é constituída por 50 jovens universitários, com idades entre 18 e 32 anos, que participaram voluntariamente no estudo e manifestaram o seu consentimento informado. A estes 50 indivíduos foram colhidas amostras de sangue e também lhes foi pedido que respondessem a um pequeno inquérito para avaliação da prevalência de alergia a pólen. A cada indivíduo foi atribuído um código com a letra V, seguido de um numeral árabe e as análises foram realizadas mantendo o anonimato dos participantes.

### **4.2.2. Questionário para avaliação da prevalência de alergia a pólen na população em estudo**

O questionário aplicado compôs-se de um total de oito questões (Anexo 1). 5 destas questões dirigem-se à caracterização sociodemográfica da população incluída no estudo e incidem sobre os hábitos tabágicos e de ingestão de álcool e de estilo de vida. O questionário incluiu ainda questões dirigidas à sintomatologia alérgica.

Na análise do questionário, foi estabelecida uma escala, baseada nas três perguntas consideradas mais relevantes para avaliar se os indivíduos sofrem de polinose (pergunta 3, pergunta 5 e pergunta 8), da qual resulta a atribuição de uma pontuação.

### **4.2.3. Colheita e processamento dos soros**

As amostras de sangue foram colhidas com a colaboração dos enfermeiros Elsa Pires e Luis Baixinho do Hospital do Espírito Santo de Évora, em tubos com EDTA como agente anticoagulante. Seguida a recolha, as amostras de sangue foram centrifugadas para eliminação do componente celular e os soros foram conservados a -20°C e.

Posterior a este trabalho foi quantificada a IgE total por ELISA, por aplicação do “Human IgE ELISA Kit” (Innovative Research, Inc).

#### 4.2.4. Obtenção e preparação dos extratos de pólen

O pólen de *D. glomerata* foi comprado na Allergome AB, Suécia. O pólen de *Q. rotundifolia* foi colhido no Pólo da Mitra da Universidade de Évora e o pólen de *P. hybrida* foi colhido também no Pólo da Mitra da Universidade de Évora e perto do Hospital do Espírito Santo de Évora, durante as suas respetivas épocas polínicas do ano de 2017.

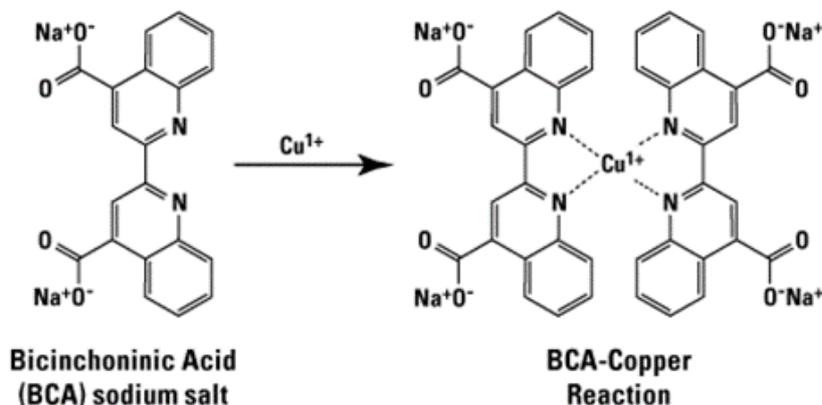
Para a preparação dos extratos proteicos de pólen das espécies descritas anteriormente começou-se por pesar 0,1 g de pólen da espécie para um tubo de Falcon de 15 mL e adicionaram-se 10 mL de Tampão de Extração de Bicarbonato de Amónio. Seguidamente incubaram-se os tubos à temperatura ambiente durante 2 horas, em agitação rotativa e com os tubos protegidos da luz. Passado este tempo as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 3000 g. Posteriormente retirou-se o sobrenadante, adicionaram-se mais 5 mL de Tampão de Extração, voltando-se a incubar os tubos com as mesmas condições anteriores. No fim, centrifugaram-se as amostras novamente durante 10 minutos a 3000 g e recolheram-se os sobrenadantes, que se adicionaram aos anteriormente recolhidos. Os sobrenadantes foram aliqotados em volumes de 5 mL e congelados para posterior liofilização. A liofilização permite o processo de secagem da amostra através da remoção de água por sublimação, onde os constituintes dos tampões de extração volatizam, libertando CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>, obtendo-se assim um sedimento sólido constituído pelos compostos extraídos do pólen.

Depois do processo anterior, obtiveram-se os extratos proteicos secos de *Q. rotundifolia*, *P. hybrida* e *D. glomerata*. Para preparação das amostras de trabalho, estes extratos foram diluídos em água bidestilada até dissolução completa (cerca de 200 mg/mL para *P. hybrida* e *D. glomerata* e cerca de 100 mg/mL para *Q. rotundifolia*). As amostras foram colocadas em gelo, de modo a permitir a hidratação proteica. Depois da sua dissolução, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos, a 3000 g para remover detritos não solúveis. Depois de retirar o sobrenadante, este foi armazenado a -20°C.

#### 4.2.5. Quantificação da proteína

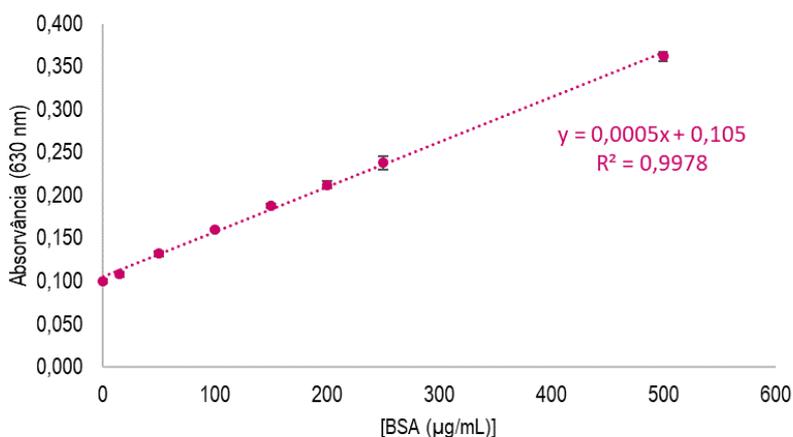
Para a quantificação da proteína usou-se o Micro BCA TH Protein Assay Kit (Thermo Scientific). A mistura de reagentes a adicionar às proteínas é constituída por uma solução a pH 11,25 contendo ácido bicinconínico (BCA), carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, tartarato de sódio e sulfato de cobre (II) pentahidratado. O princípio do método consiste em duas reações: na primeira, as ligações peptídicas das proteínas reduzem os iões Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup>, reação esta dependente da temperatura, sendo que a quantidade de Cu<sup>2+</sup> reduzido é proporcional à quantidade de proteína presente; na segunda reação, duas moléculas de BCA formam um quelato com cada ião Cu<sup>+</sup>, originando um complexo púrpura, que absorve radiação a 562 nm.

O complexo de BCA e  $\text{Cu}^+$  é influenciado pela presença nas proteínas, de cadeias laterais dos resíduos de cisteína ou cistina, tirosina e triptofano.



**Figura 9:** Reação química representativa da formação do complexo corado BCA com o  $\text{Cu}^+$  (retirado de thermofisher.com)

Em primeiro lugar começou-se por preparar padrões de albumina de soro bovino (BSA), a utilizar como padrão, com concentrações entre 0 e 1 mg/mL em água bidestilada. Os extratos de pólen foram diluídos entre 50 vezes e 400 vezes. O reagente proveniente do kit foi preparado de acordo com as proporções de três reagentes (25A:24B:1C). Seguidamente pipetou-se, numa microplaca e em triplicados, 25  $\mu\text{L}$  dos extratos diluídos e dos padrões de BSA e 100  $\mu\text{L}$  do reagente preparado. Por fim incubou-se a microplaca a 43°C durante 1 hora e 30 minutos. Finalizado o tempo de incubação leu-se a absorvância a 630 nm num espectrofotómetro.



**Figura 10:** Exemplo de curva de calibração obtida através do método do BCA utilizando padrões de BSA. Os pontos representam a média de triplicados.

## 4.2.6. Enzyme Allergo Sorbent Test (EAST)

O EAST consiste num teste de diagnóstico utilizado para detetar a presença de alergénios específicos a anticorpos IgE e é também utilizado na quantificação da atividade alergénica total de uma preparação. O EAST utiliza o mesmo princípio de Radio Allergo Sorbent Test (RAST), primeiramente descrito por Wide e colegas em 1967. Na sua forma original, o RAST implica o uso de um disco de papel como fase sólida onde os alergénios são adsorvidos, para posteriormente se ligarem a anticorpos específicos destes alergénios de todos os isotipos, sendo utilizado primariamente para IgE, IgG e IgA do soro. Segue-se uma lavagem com tampão de lavagem para remover as proteínas do soro que não foram ligadas, e a IgE ligada seria então detetada com uma anti-IgE humana policlonal marcada com  $I^{125}$ . No entanto, no EAST, existiu a substituição dos anticorpos policlonais radiomarcados por anticorpos monoclonais de deteção marcados com um enzima, geralmente sendo utilizada a fostatase alcalina (E.C. 3.1.3.1) ou a peroxidase de rábano (E.C. 1.11.1.7) (Plebani, 2003; Stulik & Ticha, 2002). Neste caso utilizou-se a metodologia descrita por Wigotzki e colegas para uma otimização deste teste e para determinar a sensibilização dos indivíduos a pólen de espécies que são alergologicamente relevantes no Alentejo (Wigotzki, Steinhart, & Paschke, 2001).

A primeira etapa do EAST envolve o revestimento dos discos de nitrocelulose com um extrato proteico de pólen de uma espécie relevante para o estudo. O extrato proteico foi preparado em tampão de incubação (0,3% BSA, 0,1% Tween-20 em PBS (Anexo 2), onde a concentração final de extrato foi de 0,5 mg/mL. Os discos foram primeiramente lavados com tampão de lavagem (0,5% Tween-20 em PBS 1X) e seguidamente foram colocados numa placa de petri, mergulhados no extrato proteico. A placa de petri foi revestida de modo a que os discos ficassem protegidos da luz e foram incubados *overnight* a 4°C.

A segunda etapa consiste no bloqueio dos discos. Os discos foram primeiro lavados com tampão de lavagem e colocados numa microplaca. Seguidamente adicionaram-se 100  $\mu$ L da solução de bloqueio (1% BSA 0,1% Tween-20 em PBS 1X) e a microplaca seguiu para incubação durante 1 hora à temperatura ambiente.

A terceira etapa consiste na ligação dos soros humanos. Finalizada a etapa do bloqueio, retirou-se a solução de bloqueio dos poços da microplaca e adicionaram-se 50  $\mu$ L de soro a cada poço, previamente diluído 1:20 em tampão de incubação. Seguiu para incubação durante 4 horas, à temperatura ambiente e em agitação.

A quarta etapa consiste na deteção da IgE ligada, através da utilização de um Anticorpo Secundário. Neste caso foi utilizado uma anti-IgE humana marcada com fosfatase alcalina (Monoclonal Anti-Human IgE-Alkaline Phosphatase antibody produced in mouse, Sigma Aldrich). Os anticorpos anti-IgE humanos específicos são utilizados como reagentes de captura e deteção, conferindo assim especificidade nos ensaios (Plebani, 2003). Os discos, finalizada a etapa anterior, foram lavados três vezes com tampão de lavagem. Seguidamente foram

adicionados 50 µL de Anticorpo Secundário, previamente diluído numa diluição de 1:8000 em tampão de incubação, durante 30 minutos, em agitação.

A quinta e última etapa deste teste consiste na revelação do complexo alergénio-anticorpo primário-anticorpo secundário através da utilização de um substrato, e neste caso foi utilizado o *p*-nitrofenil fosfato (pNPP) (SIGMAFAST™ *p*-Nitrophenyl phosphate Tablets). Este é um substrato que é hidrolisado pela fosfatase alcalina, sendo libertado o *p*-nitrofenol, que tem uma coloração amarela, podendo ser detetada a sua presença por espectrometria de absorção molecular, a 405 nm (Voller, Bidwell, & Bartlett, 1976). Para isso, finalizada a etapa anterior voltaram-se a lavar os discos três vezes com tampão de lavagem e adicionaram-se 150 µL de solução de substrato a cada poço. O substrato esteve a reagir durante 3 horas. Finalizado o tempo de reação, retiraram-se 100 µL da solução para uma nova microplaca e adicionaram-se 50 µL de NaOH 3M para parar a reação. Por fim leu-se a absorvância das soluções presentes na microplaca num espectrofotómetro de microplacas, a um comprimento de onda de 405 nm e com referência a 630 nm.

## 4.2.7. Immunoblotting

O *Immunoblotting* é uma técnica imunológica, também conhecida como *Western Blotting* ou *Protein Blotting*. As proteínas separadas eletroforéticamente são transferidas para uma membrana de forma a obter uma réplica do padrão de proteínas do gel. O *blotting* de proteínas combina a capacidade analítica da eletroforese e a especificidade das sondas utilizadas, nomeadamente os anticorpos, no caso do *Immunoblotting*. Este método permite ultrapassar as dificuldades de análise de moléculas em géis. As membranas são mais fáceis de manusear e guardar, as proteínas estão mais acessíveis aos anticorpos, a resolução das bandas deixa de ser afetada por efeitos de difusão, permitindo ainda a possibilidade de se conseguir efetuar análises múltiplas. Uma outra vantagem do *Immunoblotting* é de não necessitar de menos amostra de proteína pois, devido à grande especificidade da ligação antigénio-anticorpo, é uma técnica de grande sensibilidade (Quintas, A., Freire, A. P., & Halpern, 2008).

### 4.2.7.1. Preparação das amostras e eletroforese

A técnica de separação de proteínas utilizada foi a SDS-PAGE, em sistema tampão de Laemmli. Os géis são bons suportes na migração electroforética, porque suprimem as correntes convectivas produzidas por pequenos gradientes de temperatura, e, para além disso, neste caso, servem de crivos moleculares que aumentam a separação. Os géis mais utilizados para separar misturas de proteínas são de poliácridamida, um polímero que se obtém por reação entre a acrilamida e o N,N'-metileno-bis-acrilamida. Esta reação processa-se

em presença de um catalisador, o persulfato de amónio (APS). O N,N,N',N'-tetrametilene-diamina (TEMED) é utilizado, geralmente, como iniciador da reação uma vez que catalisa a reação de decomposição do ião persulfato em radical livre. Esta técnica utiliza o dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente aniónico capaz de se ligar fortemente às proteínas, desnaturando-as e conferindo-lhes uma carga negativa. Nesta técnica, as proteínas são desnaturados pela presença de SDS, que modifica também a sua carga superficial; todas as proteínas migram no sentido do polo positivo, funcionando o gel como um crivo molecular que condiciona a separação das proteínas com base nas suas massas moleculares (Quintas, A., Freire, A. P., & Halpern, 2008).

O sistema de eletroforese foi montado de acordo com as indicações do fabricante (BIO-RAD Mini Protean 3-Cell). Os vidros foram limpos com etanol para não existirem resíduos. O gel de resolução de 13% foi preparado de acordo com as soluções apresentadas na **Tabela 6**. A solução foi aplicada nos vidros, adicionou-se água bidestilada no restante do vidro e esperou-se a polimerização do gel. Seguidamente retirou-se a água bidestilada do topo do gel de resolução e preparou-se o gel de concentração de 4,5%, com as soluções apresentadas também na **Tabela 6**. Aplicou-se a solução e o pente de poço contínuo no vidro e deixou-se polimerizar. Depois da polimerização retirou-se o pente e lavou-se os poços com água bidestilada.

**Tabela 6:** Reagentes e soluções para a preparação de géis de SDS-PAGE

Gel de Resolução (13%)		Gel de Concentração (4,5%)	
H <sub>2</sub> O destilada	3,1 mL	H <sub>2</sub> O destilada	3,05 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,25 mL
SDS	100 µL	SDS 10%	50 µL
Acrilamida/Bis	4,3 mL	Acrilamida/Bis (30%)	0,65 mL
APS 10%	75 µL	APS 10%	75 µL
TEMED	10 µL	TEMED	5 µL

Terminado o gel, preparou-se a amostra proteica, que neste caso foram os extratos proteicos de pólen das espécies referidas anteriormente. A amostra foi preparada de forma a que o volume final da amostra teria 5/6 de extrato proteico e 1/6 de tampão da amostra 6x (Anexo 2). Seguidamente a amostra foi aquecida a 95°C, durante 5 minutos, para as proteínas desnaturarem. Montou-se a câmara interna da eletroforese e encheu-se a tina com Tampão de “Corrida” (Anexo 2). Foram aplicados 200 µL de amostra no poço contínuo e 3 µL de padrão de massas moleculares (Bio-Rad #161-0374) no poço do padrão. Na câmara externa também foi adicionado Tampão de Corrida e a tina foi preenchida completamente. Ligou-se a fonte de alimentação, a uma voltagem constante de 140 V (60 mA, 15 Watt). Por fim desligou-se a corrente quando o azul de bromofenol atingiu o fim do gel, o que pode demorar cerca de 90 a 120 minutos.

#### 4.2.7.2. Transferência eletroforética

Finalizada a eletroforese, seguiu-se para a transferência eletroforética. Começou-se por cortar uma membrana de PVDF e papel de filtro com as dimensões do gel. Retirou-se o gel do sistema de eletroforese, onde foi colocado em tampão de transferência para ser equilibrado, durante 15 minutos. Seguidamente ativou-se a membrana com metanol durante 5 segundos, seguidamente foi passada por água destilada e por fim embebida em tampão de transferência. Tanto as placas de fibra como o papel de filtro foram embebidos em tampão de transferência também. Preparou-se a *sandwich* do gel da seguinte forma: primeiramente colocou-se a cassete com a face preta virada para baixo, uma placa de fibra, três folhas de papel de filtro, o gel, a membrana de PVDF, três folhas de papel de filtro e novamente uma placa de fibra. Teve-se o cuidado de remover quaisquer bolhas que se possam ter formado e por fim fechou-se a cassete, ficando a face transparente voltada para cima.

As cassetes foram colocadas no suporte e na tina, que foi enchida completamente com tampão de transferência. Ainda se adicionou um agitador magnético e uma unidade de arrefecimento a fim da temperatura do tampão e a sua distribuição iónica se manterem-se constantes. Depois de se colocar a tampa, iniciou-se a transferência eletroforética com as seguintes propriedades: amperagem constante 350 mA (150 V, 40 Watt). A transferência durou 1 hora. Finalizada esta etapa, abriu-se a *sandwich* e removeu-se a membrana.

O padrão e um pedaço da membrana foram mergulhados em Ponceau de modo a se poder visualizar as bandas proteicas das espécies em estudo.

#### 4.2.7.3. Imunodeteção

A fase da imunodeteção iniciou-se com uma membrana cortada em vários tiras, de acordo com o número de amostras a testar. As tiras da membrana começaram por ser bloqueadas com 5% (p/v) de leite magro em TBST (Anexo 2), durante 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente e em agitação rotativa, ou então este passo poderia ser feito *overnight* a 4°C e em agitação rotativa.

Finalizada esta etapa, removeu-se o excesso de bloqueio com TBST e procedeu-se à incubação das tiras com soro, preparado previamente numa diluição 1:20. Os soros inibidos com *D. glomerata* foram incubados com uma tira de nitrocelulose embebida em extrato desta, no mínimo 30 minutos antes de ser utilizado nas tiras de membrana. As tiras de membrana foram incubadas então com os vários soros durante duas horas, à temperatura ambiente e em agitação rotativa, ou então este passo poderia ser feito também *overnight* a 4°C e também em agitação rotativa. Após a incubação com os vários soros, as tiras de membrana foram lavadas três vezes com TBST, onde as lavagens duraram cada uma 10 minutos e foram feitas em agitação rotativa.

Finalizadas as lavagens, seguiu-se a incubação com um anti-IgE (Monoclonal Anti-Human IgE antibody produced in mouse, I6510, Sigma Aldrich). Este anti-IgE consiste num anticorpo IgG2b derivado do hibridoma produzido pelas células do mieloma de ratinho e esplenócitos de rato. O anti-IgE foi previamente diluído em TBST, numa diluição de 1:10 000. As tiras de membrana foram incubadas nesta solução durante duas horas, a uma temperatura ambiente e em agitação rotativa. Após esta incubação, as tiras voltaram a ser lavadas três vezes com TBST, com as mesmas condições das lavagens anteriores.

Finalizadas as lavagens, procedeu-se à incubação com um anti-IgG (Anti-Mouse IgG (whole molecule) - Peroxidase, A9044, Sigma Aldrich). Este anti-IgG é produzido em coelho utilizando IgG de ratinho purificado como imunogénio, sendo posteriormente conjugado com peroxidase. O anti-IgG foi também previamente diluído em TBST, numa diluição de 1: 30 000. As tiras de membrana voltaram a ser incubadas durante duas horas, a uma temperatura ambiente e em agitação rotativa. Novamente, após esta incubação, as tiras voltaram a ser lavadas três vezes com TBST, com as mesmas condições das outras lavagens.

Como último passo, a revelação foi feita com o substrato tritrametilbenzidina (TMB) (Liquid Substrate system for membranes, T0565, Sigma Aldrich). O produto da peroxidação do TMB é um sólido azul escuro que se deposita no local onde ocorre a reação, permitindo a visualização das bandas imunomarcadas. Para esta revelação, retira-se o excesso de líquido das membranas, secando-as suavemente em papel de filtro e, de seguida, são embebidas em 3 mL deste substrato, ficando a reagir cerca de 10 a 20 minutos, até se verificar o desenvolvimento da cor azul. Posteriormente, as tiras são lavadas com água. Quando secas pode-se seguir para o registo de bandas visíveis. A captação de imagem foi realizada com recurso a uma câmara fotográfica convencional

A intensidade relativa das bandas foi analisada com o software de análise de imagens ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

# 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1. Caracterização da população em estudo

Este trabalho envolveu 50 indivíduos de uma população jovem universitária, com idades compreendidas entre 18 e 32 anos, é constituída por 64% indivíduos do sexo feminino e 36% do sexo masculino. À população envolvida, aplicou-se um inquérito com questões sobre os hábitos de vida e uma escala de avaliação de presença polinose. O inquérito despistou ainda a presença de condições crónicas tais como diabetes ou toma de medicação.

29 indivíduos declararam não fumar, 28 declararam não beber álcool com regularidade, 45 declararam não tomar medicação regularmente e todos referiram não sofrer de diabetes.

A escala de avaliação foi constituída por 3 questões relevantes para identificar a presença de polinose:

- ✚ Pergunta 3: Apresenta alguma doença relativa ao sistema imunológico?
- ✚ Pergunta 5: Apresenta alguma alergia?
- ✚ Pergunta 8: Encontra-se frequentemente constipado entre março e junho?

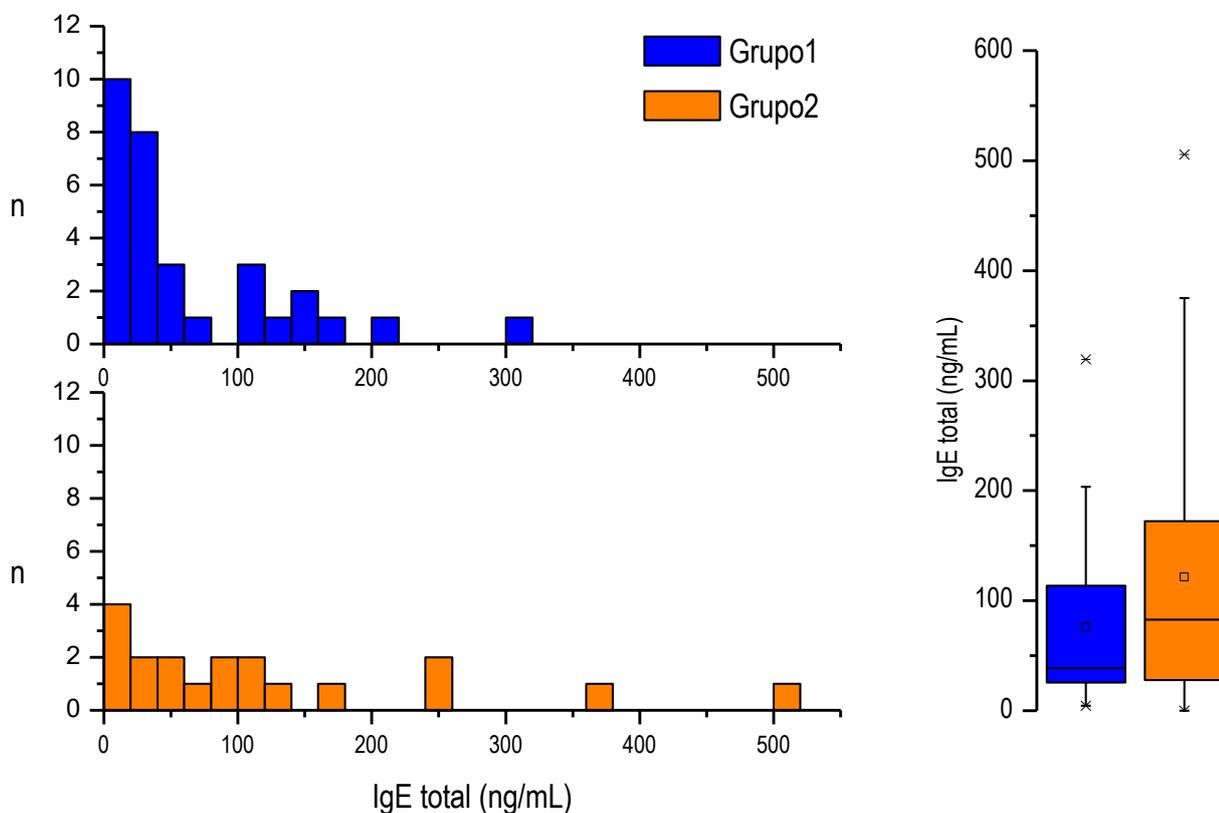
A **Tabela 7** descreve os 50 indivíduos envolvidos no estudo, em que 19 destes responderam sim a pelo menos 1 das perguntas-chave e os restantes 31 responderam não às três.

**Tabela 7:** Indivíduos que responderam “Não” ou “Sim” às perguntas-chave

IND	Não	SIM			IND	Não	SIM			IND	Não	SIM		
		P3	P5	P8			P3	P5	P8			P3	P5	P8
V01	X				V19	X				V41		X	X	
V02				X	V20	X				V42	X			
V03		X	X	X	V22	X				V44		X	X	
V04	X				V23	X				V45	X			
V05	X				V25	X				V46	X			
V06	X				V26	X				V47			X	
V07	X				V27				X	V48		X		
V08	X				V29		X			V49			X	
V09	X				V30	X				V50		X	X	
V11	X				V31			X		V51	X	X	X	
V12			X		V34	X				V52		X	X	
V13	X				V35			X	X	V53		X		
V14	X				V36			X		V54	X			
V15	X				V37	X				V59	X			
V16	X				V38	X				V62	X			
V17		X	X	X	V39	X				V63	X			
V18	X				V40			X	X					

A análise dos resultados da **Tabela 7** permitiu constituir 2 grupos, o grupo 1 (G1) com base na resposta negativa às perguntas-chave e o grupo 2 (G2) com base na resposta positiva às mesmas. Assim sendo, o grupo 1 é constituído por 31 indivíduos e o grupo 2 por 19 indivíduos.

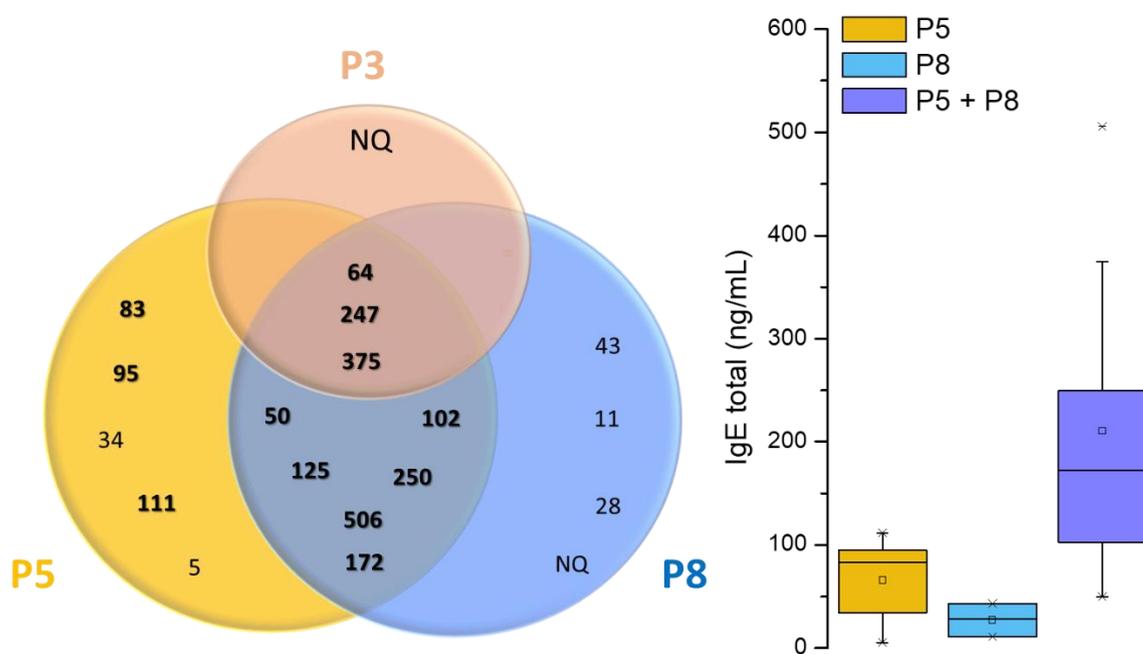
A **Figura 11** mostra os histogramas da IgE no G1 e no G2; é possível visualizar que maior parte dos indivíduos do G1 possuem uma IgE total inferior a 60 ng/mL (N=21), enquanto no G2 existe uma dispersão maior de valores de IgE total, sendo de realçar que a maioria exibe uma IgE > 60ng/mL (N=11). A caixa-de-bigodes mostra que quer a média e quer a mediana do G1 são muito inferiores às observadas no G2 Num intervalo de confiança de 90% (76 ng/mL e 128,1 ng/mL, respetivamente,  $p=0,074$ ). Procedeu-se a um teste de ANOVA que se obteve um valor de  $p=0,074$ . os dois grupos são estatisticamente diferentes. De realçar ainda que no grupo 1 estão incluídos 5 indivíduos cuja IgE total não foi quantificável enquanto no grupo 2 existem apenas dois casos.



**Figura 11:** Histograma e caixa de bigodes dos grupos de indivíduos em estudo. O grupo 1 é referente aos indivíduos que responderam negativamente às três perguntas-chave e o grupo 2 é referente aos indivíduos que responderam positivamente a pelo menos uma das perguntas-chave.

Procedeu-se a uma análise mais detalhada do G2. Para tal procedeu-se a uma análise detalhada das respostas às questões da escala. A figura 13 constitui um diagrama de Venn das respostas às questões P3, P5 e P8, para se observar as associações entre estas.

De acordo com a **Figura 12** e a **Tabela 7**, é possível observar que 1 indivíduo respondeu positivamente apenas à P3, 5 indivíduos responderam positivamente apenas à P5 e 4 indivíduos responderam positivamente apenas à P8. É possível também denotar que não existe associação de respostas da P3 com a P5 e da P3 com a P8. No caso da associação de respostas da P5 e P8, 6 indivíduos responderam positivamente a estas duas perguntas. Na associação das três perguntas-chave, 3 indivíduos responderam positivamente.



**Figura 12:** Diagrama de Venn e caixa-de-bigodes: associação das três perguntas-chave do inquérito.

A negrito estão assinalados os valores de IgE > 50 ng/mL.

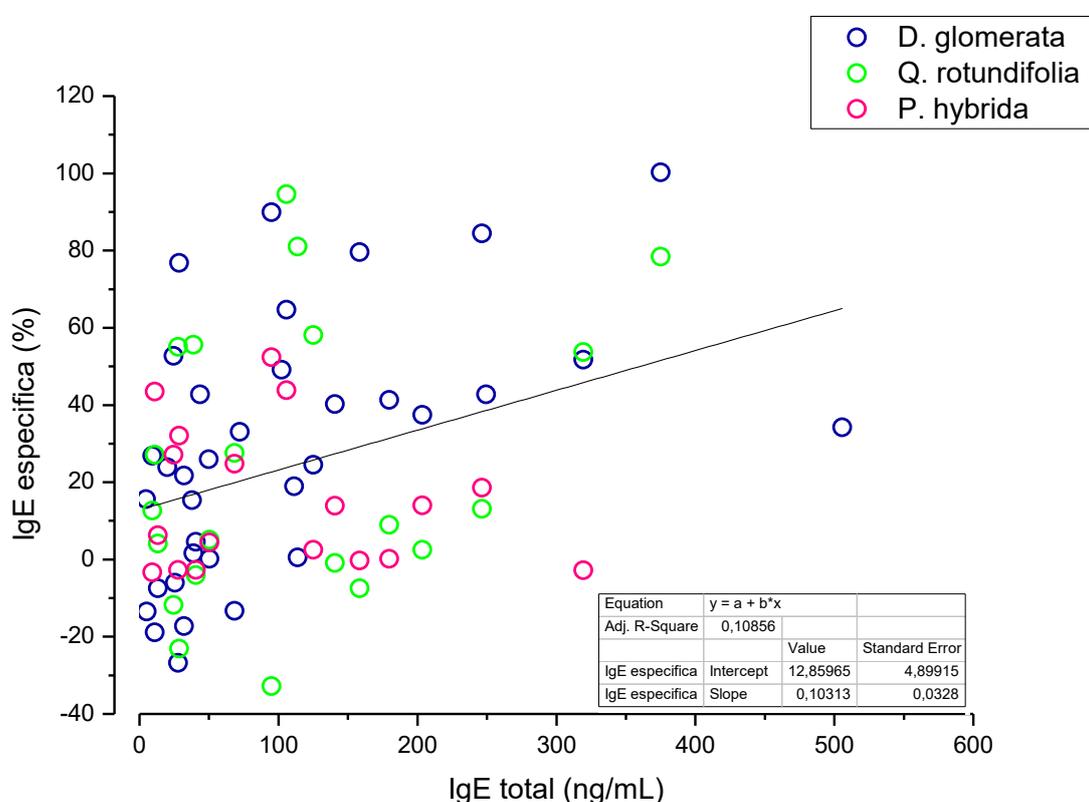
Na **Figura 12** também é possível visualizar que os valores de IgE total mais altos encontram-se na associação da P5 e P8 e na associação das três perguntas, obtendo-se resultados médios de IgE total de  $65,8 \pm 44,4$  ng/mL para a P5,  $27,3 \pm 16,2$  ng/mL para a P8 e  $210,5 \pm 151,4$  ng/mL para a associação de ambas as perguntas. Assim os resultados sugerem que a associação da P5 e P8 permite identificar os indivíduos que sofrem de polinose. A associação das três perguntas sugere que os indivíduos que responderam positivamente às mesmas, provavelmente já têm diagnóstico às doenças alérgicas. O indivíduo V29, que corresponde ao único

que respondeu apenas à pergunta 3, referenciou que sofria de uma doença autoimune e não possui IgE total quantificável, pelo que foi excluído das análises posteriores.

## 5.2. Avaliação da sensibilização a espécies relevantes na região

### 5.2.1. Validação do método EAST

Para avaliar a sensibilização às espécies em estudo recorreu-se ao método EAST que permite identificar a IgE específica aos alérgenos que ficaram adsorvidos na fase sólida do ensaio. Para o extrato de *D. glomerata* foram testados 38 indivíduos, para o extrato de *Q. rotundifolia* 23 indivíduos e para o extrato de *P. hybrida* 21 indivíduos.



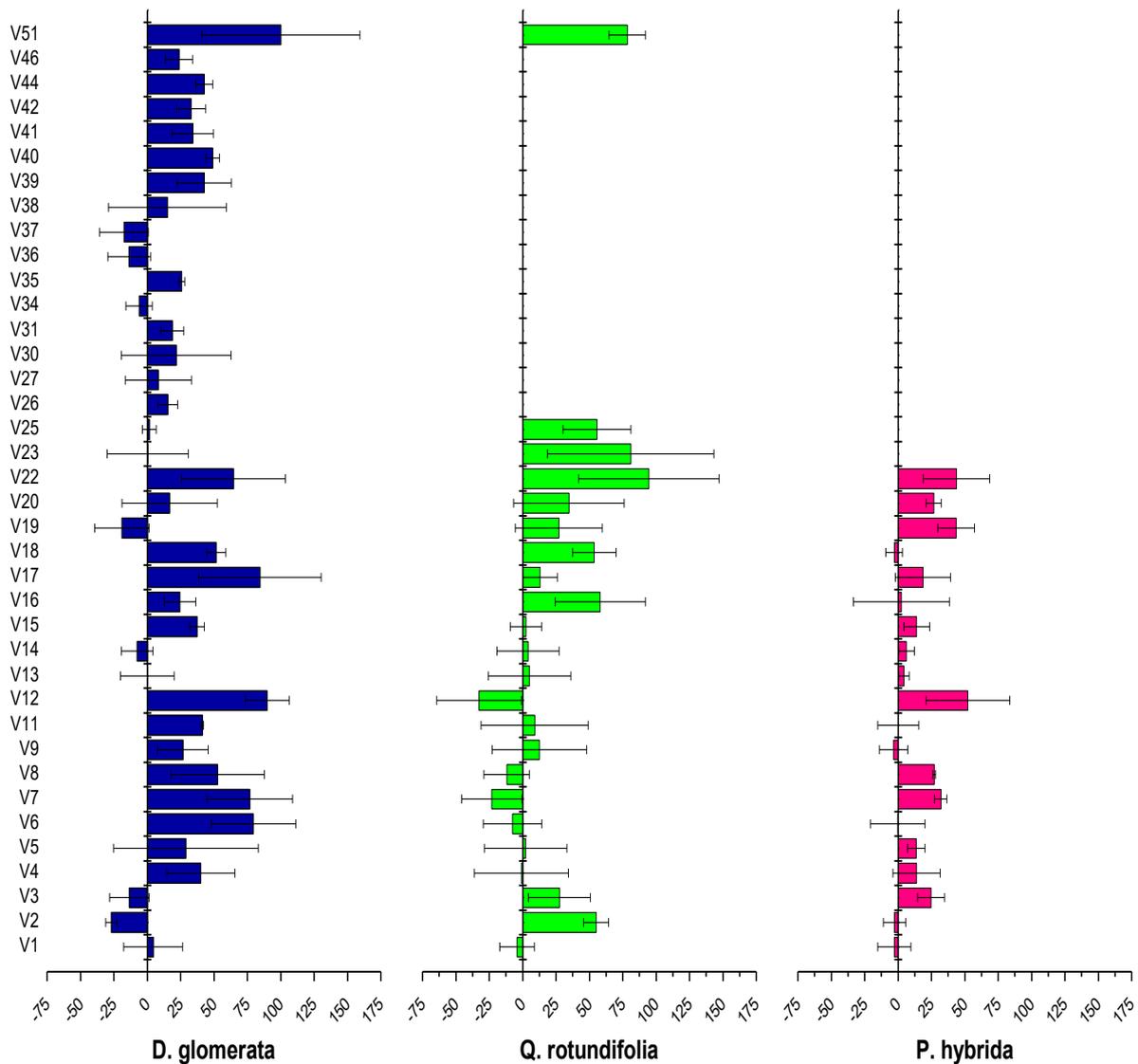
**Figura 13:** Estudo de correlação entre a IgE total e a IgE específica para as três espécies em estudo.

Uma análise de correlação que relaciona o nível de IgE total e da IgE específica relativa aos extratos polínicos analisados (**Figura 13**) mostra que o ajuste linear aos dados ( $p=0,01058$ ) tem a sua ordenada na origem em  $12,9 \pm 4,9\%$ , valor abaixo do qual a IgE específica não é fiável, pelo que se estabeleceu o valor de 20% como o limite mínimo de deteção do método EAST.

Utilizando esta técnica foi possível analisar a sensibilização de cada indivíduo às três espécies anteriormente designadas.

## 5.2.2. Determinação da sensibilização às espécies em estudo

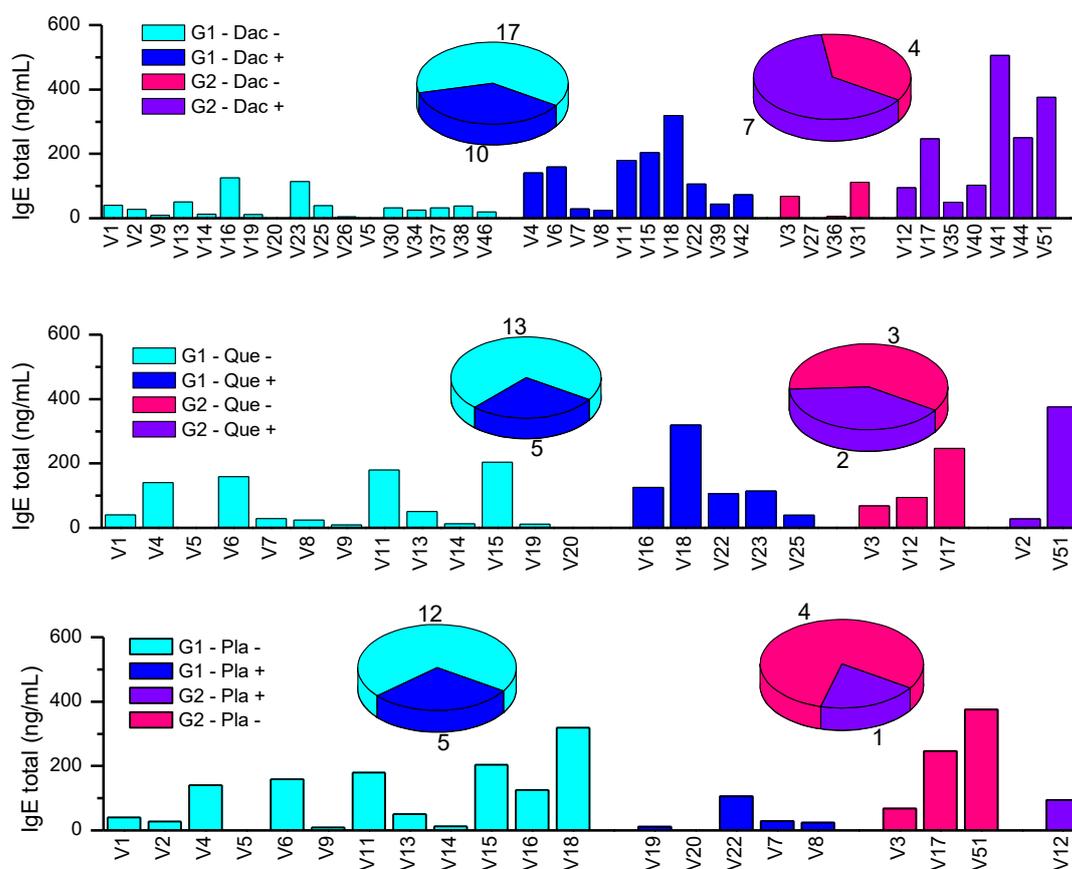
A sensibilização dos indivíduos avaliados a *D. glomerata*, *Q. rotundifolia* e *P. hybrida* está apresentada na **Figura 14**.



**Figura 14:** Determinação da sensibilização a *D. glomerata*, *Q. rotundifolia* e *P. hybrida*. Os resultados de *D. glomerata* são representativos de 1 a 4 triplicados para cada soro  $\pm$  DP de 7 ensaios realizados em paralelo. Os resultados de *Q. rotundifolia* são representativos de 1 a 3 triplicados para cada soro  $\pm$  DP de 4 ensaios realizados em paralelo. Os resultados de *P. hybrida* são representativos de 1 triplicado para cada soro  $\pm$  DP de 2 ensaios realizados em paralelo.

De acordo com a **Figura 14** pode observar-se que 17 de 38 indivíduos apresentaram sensibilização a *D. glomerata*, correspondendo a uma percentagem de 45% de indivíduos sensibilizados a esta espécie; 7 de 23 indivíduos apresentaram sensibilização a *Q. rotundifolia*, correspondendo a uma percentagem de 30% de indivíduos sensibilizados a esta espécie e 6 de 21 indivíduos apresentaram sensibilização a *P. hybrida*, correspondendo a uma percentagem de 29% de indivíduos sensibilizados a esta espécie.

Prosseguindo a análise e correlacionando com a divisão dos grupos do inquérito obteve-se os seguintes resultados:

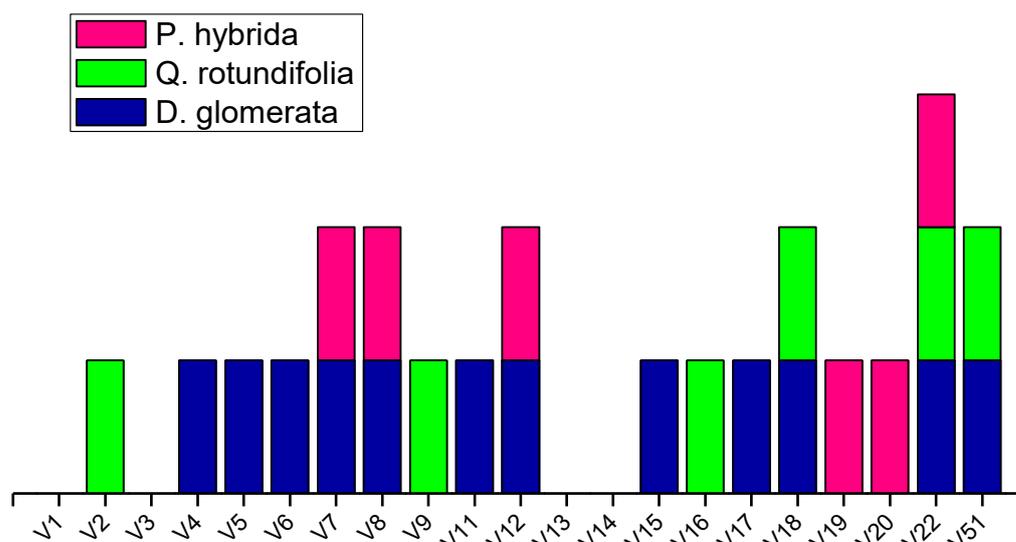


**Figura 15:** Divisão da sensibilização das espécies nos dois grupos dos inquéritos

A **Figura 15** mostra que para *D. glomerata*, 10 dos 27 indivíduos, inseridos no G1, apresentaram sensibilização à espécie. Já o G2 tem 7 em 13 indivíduos que apresentaram sensibilização a *D. glomerata*. Também é possível visualizar que os valores de IgE total são mais altos para os indivíduos que apresentaram sensibilização a esta espécie. Para *Q. rotundifolia* 5 dos 18 indivíduos, inseridos no grupo 1, apresentaram sensibilização a esta espécie e 2 dos 5 indivíduos inseridos no grupo 2 também apresentaram sensibilização a esta espécie. Neste caso não se verificou correlação do valor de IgE total com a sensibilização à espécie. Para

*P. hybrida* 5 em 17 indivíduos, inseridos no grupo 1, também apresentaram sensibilização, a estas espécies, respetivamente. Relativamente ao grupo 2, apenas 1 em 4 indivíduos, apresentou sensibilização a esta espécie. É de referir que estes dados são inconclusivos devido ao número da amostra testada no grupo 2 ser muito reduzida e também se verificou não existir correlação com o valor de IgE total.

Foi ainda avaliada a possibilidade de existir polissensibilização a estas espécies. A **Figura 16** representa a sensibilização a cada uma das espécies no conjunto de indivíduos nos quais foi possível realizar os testes EAST aos três tipos polínicos.



**Figura 16:** Indivíduos testados para as três espécies em estudo

A partir da análise da **Figura 16** é assim possível observar, que 6 indivíduos apresentam apenas sensibilização a *D. glomerata*, 3 indivíduos para *Q. rotundifolia* e 2 para *P. hybrida*. No caso de polissensibilização, 2 indivíduos apresentaram sensibilização para *Q. rotundifolia* e *D. glomerata*, 3 indivíduos apresentaram sensibilização para *P. hybrida* e *D. glomerata* e 1 indivíduo apresentou sensibilização às três espécies.

## 5.3. Reconhecimento de bandas imunorreativas e avaliação de reatividade cruzada com *D. glomerata*

Para se poder identificar bandas imunorreativas ao pólen de *D. glomerata*, *Q. rotundifolia* e *P. hybrida* recorreu-se ao *Immunoblotting*.

Todos os soros testados para as três espécies foram escolhidos com base na sua IgE total e na sua IgE específica relativa à espécie.

Para o extrato de pólen de *D. glomerata* foram testados soros de 11 indivíduos, onde 8 apresentaram no EAST ter IgE específica e 3 não apresentaram IgE específica para esta espécie. Os indivíduos que apresentaram IgE específica foram os indivíduos V6, V7, V11, V12, V17, V18, V22 e V51 e os que não apresentaram foram os indivíduos V19, V25 e V27.

**Tabela 8:** Caracterização de bandas imunorreativas em extrato proteico de pólen de *D. glomerata*. A informação +, ++ e +++ representa uma avaliação qualitativa da intensidade das bandas.

IgE total	158	28	180	95	247	319	11	106	39	32	375
IgE esp	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	
Bandas	V6	V7	V11	V12	V17	V18	V19	V22	V25	V37	V51
MM ± DP (kDa)	n = 3	n = 2	n = 2	n = 3	n = 2	n = 3	n = 1	n = 2	n = 2	n = 2	n = 3
100,2 ± 11,2						+				+	
65,9 ± 4,1	+	+		+		+				+	+
61,5 ± 3,1	+			+		+	+			+	+
51,2 ± 5,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
33,7 ± 1,7	+++	+++	+	++	+++	+++		+++	++	+++	+++
27,9 ± 0,8	++	++	++	++	++	++		++	++	++	++
23,6 ± 1,2	++	*+	++	++	++	++	*+	++	++	*+	++
20,1	+++					+					+
15,7 ± 0,4	+			+	+	+					+
14,4 ± 0,11				+	+	+					+
11,8 ± 0,3	++		+	+	+	+		+			+

\* só existiu separação dos géis até 25 kDa para estes indivíduos

Legenda: (+++ muito intensa) (++ intensa) (+ visível)

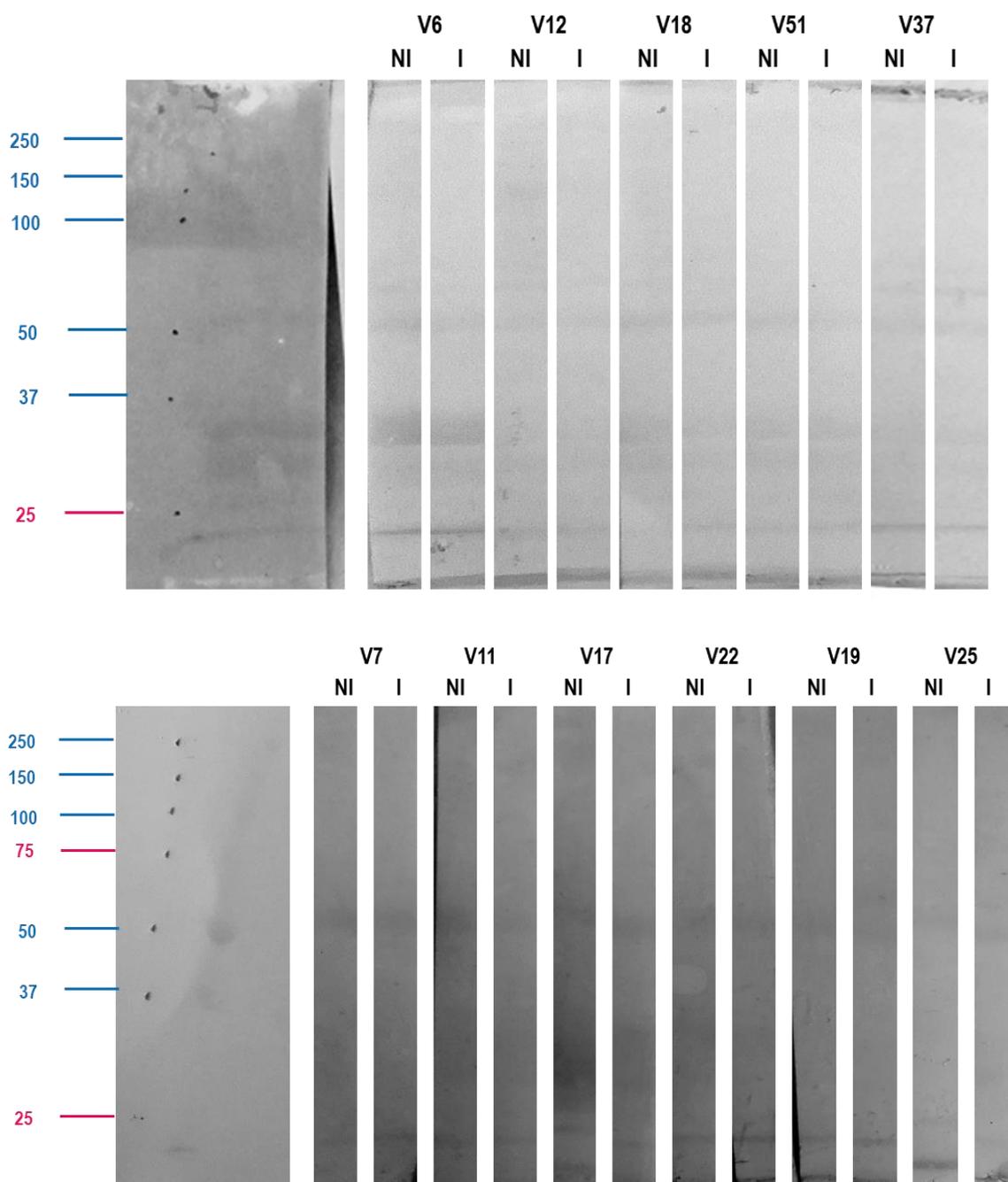
Como é possível visualizar na **Tabela 8**, identificaram-se 11 bandas imunorreativas com massas moleculares entre 100,2 ± 11,2 e 11,8 ± 0,3 kDa para o extrato proteico de *D. glomerata*. É possível observar que existem duas bandas que apareceram em 100% dos soros testados, com massas moleculares de 51,2 ± 5,4 e 23,6 ± 1,2 kDa, sendo a primeira a que apresentou maior intensidade em todos os soros testados. Com

uma intensidade semelhante a esta, há a referir a banda com massa molecular  $33,7 \pm 1,7$  kDa, identificada em 91% dos indivíduos. As bandas mais intensas observaram-se, em todos os soros, entre os 20 e os 51 kDa.

Analisando a imunoreatividade dos soros individualmente, podemos observar que o soro V18 foi o que apresentou mais bandas imunorreativas. O soro do indivíduo V19 foi o que apresentou menos bandas imunorreativas, o que pode ser justificado pelo facto de, no método EAST, não apresentar IgE específica para *D. glomerata*. As bandas imunorreativas que aparecem na análise do soro deste indivíduo e nos indivíduos V25 e V37, que poderiam sugerir incongruência com os resultados de EAST negativa para *D. glomerata*, são provavelmente consequência de, nesta técnica, as proteínas estarem desnaturadas (ao contrário do que ocorre na EAST, em que as proteínas estão no seu estado nativo) e os epítomos das proteínas estarem mais expostos para ligação à IgE, o que favorece o reconhecimento imunológico. De referir ainda que, no caso dos soros dos indivíduos V7, V19 e V37, ocorreram dificuldades técnicas nas separações proteicas, que não permitiram separar e visualizar bandas de massa inferior a 25 kDa, pelo que nestes soros poderão existir bandas imunomarcadas de massa inferior a 25 kDa,

As bandas imunomarcadas permitem sugerir a identificação de alguns alergénios já documentados para *D. glomerata*. A banda com massa molecular de  $33,7 \pm 1,7$  kDa, pode corresponder ao alergénio *major* Dac g 1, descrito com uma massa de 32 kDa, (Mecheri et al., 1985; Van Oort et al., 2004) uma vez que a massa molecular é compatível e que é uma banda apenas não detetada no soro V19, sendo que este apresentou RAST negativo para *D. glomerata* e um valor de IgE total de 11 ng/mL. A banda com massa molecular de  $27,9 \pm 0,8$  kDa, identificada também em 91% dos soros, pode corresponder a outro alergénio *major*, o Dac g 5, descrito na literatura com a massa de 26 kDa (Klysner et al., 1992). Outra banda com massa molecular de  $61,5 \pm 3,1$  kDa, identificada em 54,5% dos indivíduos, pode corresponder ao alergénio identificado com massa molecular de 60 kDa, o Dac g 13 (Grote et al., 2005; Swoboda et al., 2004). A banda com massa molecular com massa de  $14,4 \pm 0,1$  kDa, identificada em 62,5% dos indivíduos é sugestiva do Dac g 12, identificado com uma massa molecular de 13-14 kDa (Lorenz et al., 2008). A banda imunorreativa com uma massa molecular de  $11,8 \pm 0,3$  kDa, identificada em 87,5% dos indivíduos testados é sugestiva ou do Dac g 2 ou do Dac g 3, duas bandas imunorreativas *major* já identificadas com massas moleculares de 11 e 11-14 kDa, respetivamente (Guérin-Marchand & Sénechal, 1996; Roberts et al., 1992).

Sendo objetivo deste trabalho avaliar a hipótese de ocorrência de reatividade cruzada com gramíneas, na sensibilização a *Q. rotundifolia* e a *P. hybrida*, realizou-se o ensaio de controlo em que na imunorreatividade a *D. glomerata*, se inibiram os soros previamente às experiências com extrato proteico da mesma planta. Um exemplo de cada uma destas experiências está apresentado na figura seguinte, onde podem ser comparadas visualmente as bandas imunomarcadas na ausência (NI) e na ocorrência de inibição dos soros (I) (**Figura 17**).



**Figura 17:** Identificação de bandas imunorreativas dos diferentes soros testados para o extrato de *D. glomerata*. As letras NI são representativas dos soros não inibidos com *D. glomerata* e a letra I é representativa dos soros previamente inibidos com extrato de *D. glomerata*.

A observação dos blots apresentados na **Figura 17** sugere, de uma forma geral, que a inibição das bandas não é completa, pois muitas das bandas imunomarcadas surgem ainda nas experiências que decorreram com os soros inibidos. Tal poderá dever-se a que nem todos os IgE presentes nos soros tenham sido captados pelo extrato adicionado.

Realizou-se uma avaliação quantitativa da intensidade das bandas, não inibidas e inibidas, e os resultados das percentagens de inibição de cada banda estão apresentados na tabela 9.

**Tabela 9:** Percentagem de inibição das bandas imunorreativas para extrato de pólen de *D. glomerata*. As letras NQ representam “não quantificável” (o que decorre da baixa intensidade de algumas bandas que dificulta a determinação da intensidade de banda) e as letras SI representa “sem inibição”.

Bandas MM ± DP (kDa)	V6	V7	V11	V12	V17	V18	V19	V22	V25	V37	V51
100,2 ± 11,2						88,2				NQ	
65,9 ± 4,1	SI			NQ		100				NQ	NQ
61,5 ± 3,1	52,3 ± 20,6			71,9 ± 12,2		65,6 ± 21,5	NQ			NQ	NQ
51,2 ± 5,4	23,9	39,1	60	7,5 ± 6,5	SI	17,8 ± 23,2	21,3	21,8	24,9	6,2	6,8
33,7 ± 1,7	48,6 ± 28,4	NQ	NQ	67,4	100	27,3 ± 12,1		NQ	NQ	NQ	20,7
27,9 ± 0,8	SI	NQ	NQ	SI	100	47,6 ± 16,4		NQ	NQ	SI	50,1 ± 14,3
23,6 ± 1,2	48,3	NQ	12,6	40,0 ± 14	57,0	NQ	NQ	SI	NQ	NQ	NQ
20,1	92,7					SI					100
15,7 ± 0,4	48,3			SI		SI					SI
14,4 ± 0,11				NQ		NQ					NQ
11,8 ± 0,3	61,2			SI		100					NQ

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 9** e pode-se observar que, apesar de em todos os soros testados ter ocorrido inibição de bandas, há uma grande variabilidade nas percentagens de inibição, quer entre as bandas do mesmo soro, quer para a mesma banda entre diferentes soros. Isso poderá dever-se, por um lado, a que os IgE específicos para um determinado alergénio não apresentem a mesma afinidade e, por outro, a que o título em IgE seja diferente entre soros. Contudo, é possível particularizar que a banda de 51,2±5,4,

com correspondência provável à Dac g 13, apresenta, em média, valores de inibição inferiores a 20%, o que sugere que as IgE que se ligam neste componente proteico são de elevada afinidade pois uma pequena concentração disponível ainda origina imunomarcção intensa.

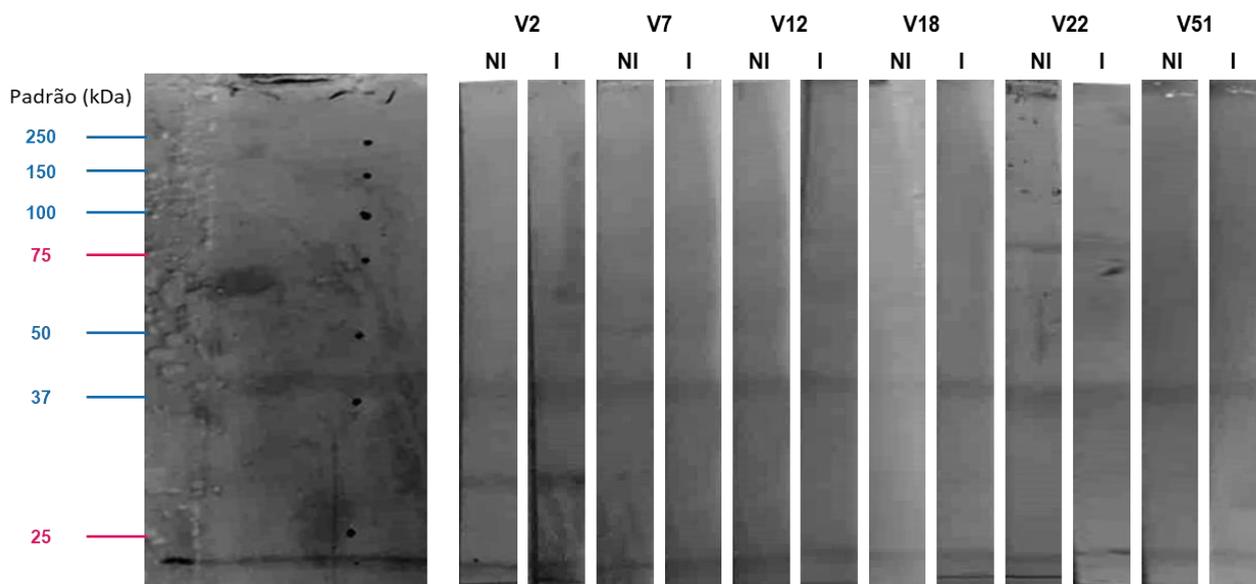
Para o extrato de pólen de *P. hybrida* foram testados os soros de 6 indivíduos, dos quais 3 apresentaram RART positivo para *P. hybrida*, m o V7, o V12 e o V22.

**Tabela 10:** Caracterização de bandas imunorreativas em extrato proteico de pólen de *P. hybrida*. A informação +, ++ e +++ representa uma avaliação qualitativa da intensidade das bandas.

Bandas MM ± DP (kDa)	V2	V7	V12	V18	V22	V51
	n = 2	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3
107,6 ± 7,0	+	+	+		++	+
78,8 ± 4,0	+	+	+		+	+
69,4 ± 1,3	+			+	+	+
61,3 ± 1,6	+	+	+	+	+	+
51,3 ± 2,4	+	+	+	++	+	++
49,1 ± 0,6					+	
40,2 ± 1,3	+++	+++	++	++	++	+++
29,9 ± 2,5	+++					
21,0 ± 0,3	++	++	++	++	++	++
>20,0	++	++	++	++	++	++

Como se visualiza na **Tabela 10**, foi possível identificar no blot, após a separação por SDS-PAGE do extrato proteico de pólen de *P. hybrida*, 9 bandas imunorreativas entre a massa molecular de 107,6 ± 7,0 e 21,0 ± 0,3 kDa, havendo ainda imunoreactividade na banda de 20KDa, que foi o limite da separação do gel, logo, nesta banda, encontrar-se-ão todos as proteínas de massa molecular inferior a este valor.. É possível visualizar que as existem 4 bandas que aparecem em 100% dos soros testados (~61, ~51, ~40 e ~21). A banda que foi identificada a 40,2 ± 1,3 kDa sugere a sua correspondência ao alergénio Pla a 2, descrito na literatura com uma massa 43 kDa (Asturias et al., 2002). A banda identificada com uma massa molecular de 21,0 ± 0,3 kDa pode corresponder ao Pla TLP, uma banda caracterizada com massa molecular de 25 kDa (Palacín et al., 2012). A banda imunomarcada com uma massa molecular inferior a 20 kDa contém, provavelmente, o alergénio identificado Pla 1, que tem uma massa molecular de 18 kDa (Asturias et al., 2002).

Para caracterizar a reatividade cruzada de *P. hybrida* com *D. glomerata*, foram utilizados os mesmos soros descritos anteriormente. Na **Figura 18** mostra-se um dos blots característicos das três réplicas realizadas. Pode observar-se que nos soros inibidos com extracto de *D. glomerata* ainda é possível identificar várias bandas, ocorrendo o desaparecimento de outras.



**Figura 18:** Identificação de bandas imunorreativas dos diferentes soros testados para o extrato de *P. hybrida*. As letras NI são representativas dos soros não inibidos com *D. glomerata* e a letra I é representativa dos soros previamente inibidos com extrato de *D. glomerata*.

Procedeu-se à análise das intensidades de banda e cálculo da percentagem de inibição de cada banda. Esses resultados estão apresentados na **Tabela 11**.

**Tabela 11:** Percentagem de inibição das bandas imunorreativas para extrato de pólen de *P. hybrida*. As letras NQ representa “não quantificável” e as letras SI representa “sem inibição”.

Bandas MM ± DP (kDa)	V2	V7	V12	V18	V22	V51
107,6 ± 7,0	18,5	45,3	31,4		28,7	NQ
78,8 ± 4,0	48,9	NQ	37,0		NQ	NQ
69,4 ± 1,3	17,6			48,8	42,2	NQ
61,3 ± 1,6	NQ	49	NQ	54,0	40,3 ± 22,2	NQ
51,3 ± 2,4	82,7	45,2±12,9	NQ	57,3	27,4 ± 1,9	SI
49,1 ± 0,6					NQ	
40,2 ± 1,3	1,6	22,5	SI	NQ	27,0	23,4
29,9 ± 2,5	5,6 ± 8,0					
21,0 ± 0,3	30,6	28,6	46,3	8,5	SI	44,0

De acordo com a **Tabela 11** é possível visualizar que as bandas com massa molecular de  $107,6 \pm 7,0$ ,  $78,8 \pm 4,0$ ,  $69,4 \pm 1,3$  kDa e  $61,3 \pm 1,6$  foram inibidas em todos os soros testados, sugerindo reatividade cruzada destas proteínas entre *P. hybrida* e *D. glomerata*. Já as banda de 40,2 kDa e a de 21kDa tiveram percentagens de inibição muito reduzidas, sugerindo reatividade específica com estas proteínas de *P. hybrida*, o que consolida a hipótese de se tratar dos alergénios Pla a 2 e Pla TLP, repetivamente, como anteriormente sugerido.

Para o extrato de pólen de *Q. rotundifolia* foram testados soros de 6 indivíduos, todos eles com RAST positivo para esta espécie, sendo que o indivíduo V2 tem um valor de RAST que é cerca de metade relativamente ao V18 e ao V56 e cerca de um terço do V22, V81 e V51.

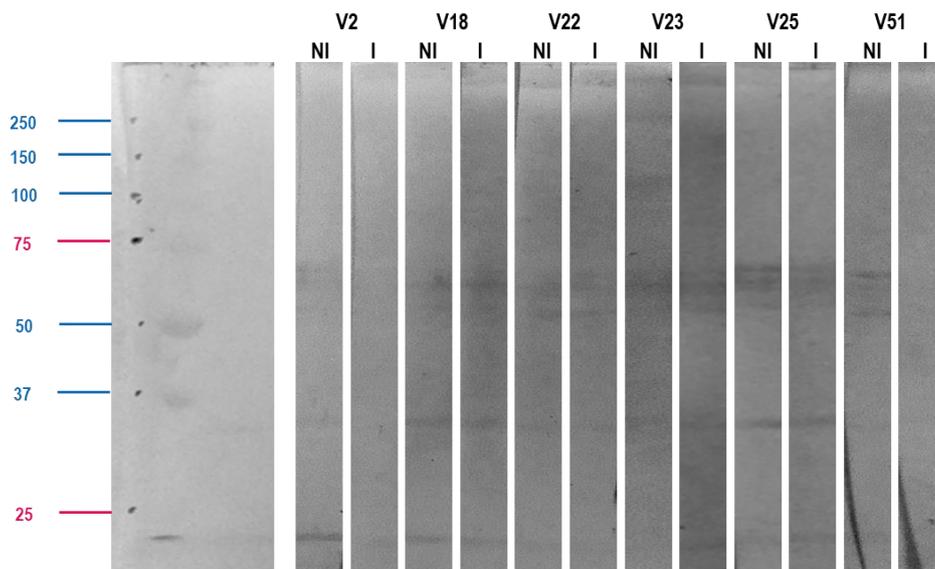
**Tabela 12:** Caracterização de bandas imunorreativas em extrato proteico de pólen de *Q. rotundifolia*. A informação +, ++ e +++ representa uma avaliação qualitativa da intensidade das bandas.

<b>Bandas</b>	<b>V2</b>	<b>V18</b>	<b>V22</b>	<b>V23</b>	<b>V25</b>	<b>V51</b>
<b>MM <math>\pm</math> DP (kDa)</b>	<b>n = 3</b>	<b>n = 3</b>	<b>n = 3</b>	<b>n = 2</b>	<b>n = 3</b>	<b>n = 3</b>
115,2				++		
$64,5 \pm 0,0$	++	+	+	+	++	++
$61,6 \pm 0,0$	++	+	+	++	+++	+
$53,8 \pm 0,3$	+	+	+	+	+	++
$32,1 \pm 0,6$	+	+++	++	++	+++	+
>25,0	+++	+++	+		+	+

De acordo com a **Tabela 12** é possível visualizar 6 bandas imunorreativas com massas moleculares compreendidas entre 115,2 e 32 kDa, havendo ainda imunorreatividade na banda de 25 kDa, que foi o limite da separação do gel, logo, nesta banda, encontrar-se-ão todos as proteínas de massa molecular inferior a este valor. É possível também visualizar 3 bandas imunorreativas com massas moleculares de  $64,5 \pm 0,0$ ;  $61,6 \pm 0,0$ ,  $53,8 \pm 0,3$ , 61,6 kDa que foram identificadas em todos os soros testados. Tendo massas próximas, surgem como bandas próximas na separação proteica, e embora correspondam, no conjunto, à zona de imunomarcção mais intensa, a intensidade relativa de cada uma destas bandas difere muito entre indivíduos (ver figura 19). Uma outra banda intensa que se observa em todos os soros ocorre a  $32,1 \pm 0,6$  kDa e a sua intensidade varia também bastante entre indivíduos.

Não existem alergénios identificados para esta espécie, como foi descrito anteriormente. Existem, contudo alergénios descritos para pólen de outras espécies do género *Quercus*, como é o caso do Que a 1 e do Que a 2, mas as massas destes são interiores a 25 kDa (Egger et al., 2008) e não poderiam ter sido identificados nestas condições experimentais.

Para caracterizar a reatividade cruzada de *Q. rotundifolia* com *D. glomerata*, foram utilizados os mesmos soros descritos anteriormente.



**Figura 19:** Identificação de bandas imunorreativas dos diferentes soros testados para o extrato de *Q. rotundifolia*. As letras NI são representativas dos soros não inibidos com *D. glomerata* e a letra I é representativa dos soros previamente inibidos com extrato de *D. glomerata*.

A observação do blott da **Figura 19**, exemplificativo das três experiências realizadas, mostra que há bandas que são inibidas pelo extracto proteico de *D. glomerata*, contudo ainda são evidentes bandas imunorreactivas nos soros inibidos. A análise da percentagem de inibição por banda está apresentada na tabela 13.

**Tabela 13:** Percentagem de inibição das bandas imunorreativas de *Q. rotundifolia*. As letras NQ representa “não quantificável” e as letras SI representa “sem inibição”

Bandas MM ± DP (kDa)	V2	V18	V22	V23	V25	V51
115,2				100		
64,5 ± 0,02	74,6	SI	SI	NQ	44,3	100
61,63	78,3	SI	SI	NQ	10,2	100
53,8 ± 0,31	71,8	SI	32,0	NQ	70,1	100
32,1 ± 0,61	75,6 ± 10,2	SI	69,4	SI	55,2 ± 39,1	33,6 ± 23,0
>25	73,9 ± 5,7	26,0 ± 14,0	35,5 ± 31,0	NQ	NQ	NQ

Pode observar-se, pelos resultados da **Tabela 13**, que há enormes variações, principalmente entre indivíduos. Os soros V51 e V2 são os que apresentam maior inibição na globalidade, sugerindo reatividade cruzada com *D. glomerata*. Apesar de o soro V2 ter apresentado RAST negativo para *D. glomerata*, é possível que ocorra reconhecimento de alérgenos por imunoblot, uma vez que na primeira técnica as proteínas estão no estado nativo e nesta última estão desnaturadas. Isso foi observado quer nos soros V25 e V37 (ver tabela 8). O soro V51 era o que apresentava um valor de RAST para *D. glomerata* mais elevado do conjunto de soros testado.

O soro V18 não teve inibição em nenhuma banda, sugerindo que este indivíduo possui IgE específica para *Q. rotundifolia*, ou que a apresenta reatividade cruzada com espécies não avaliadas neste trabalho.

## 5.4. Discussão

Dos soros avaliados por *immunoblotting*, apenas dois deles pertenciam a indivíduos que responderam positivamente às perguntas P5 e P8, sendo eles o V17 e o V51, sendo ambos caracterizados por uma IgE total elevada (246 e 375 ng/mL, respetivamente). O indivíduo V17 apresenta EAST positivo para *D. glomerata*, tendo reatividade para os alérgenos *major* identificados como Dac g 1 e Dac g 5, bem como para outros alérgenos desta espécie, o Dac g 12 e Dac g 13. O indivíduo V51 também apresenta EAST positivo para *D. glomerata*, tendo reatividade para os mesmos alérgenos identificados no V17, apresentando também reatividade para o Dac g 4. O soro deste indivíduo apresentou EAST positiva para *Q. rotundifolia*, com 5 bandas imunorreativas identificadas e, apesar de apresentar EAST negativa para *P. hybrida*, foi também possível identificar bandas imunorreativas para esta espécie. Os indivíduos V17 e V51 fazem parte do grupo daqueles que reconhecem serem alérgicos a pólen, sendo que a informação molecular é consistente com a sua percepção.

Os indivíduos V2 e V12 também pertencem ao grupo 2, sendo que o V2 apenas reconhece ter sintomas de alergia na primavera e V12 apenas reconhece sofrer de alergias. O indivíduo V2 tem uma IgE total de 28 ng/mL e apenas apresenta EAST positiva a *Q. rotundifolia*. O soro deste indivíduo não foi testado por *immunoblotting* a *D. glomerata*, mas reconhecem-se bandas imunorreativas a *P. hybrida* e a *Q. rotundifolia*, sendo que ocorreu uma forte inibição das bandas imunorreativas a *Q. rotundifolia* por inibição do soro a *D. glomerata*. Assim, apesar do EAST negativo a esta última espécie, é de considerar a hipótese de existir alguma sensibilização a *D. glomerata*. O fato de existir reconhecimento dos alérgenos identificados como Pla a 2 e Pla TLP, bem como a imunorreatividade a extrato de *Q. rotundifolia*, poderão, por si só, justificar os sintomas de polinose na primavera, identificados por este indivíduo, que não lhes atribuiu uma etiologia alérgica. No caso do indivíduo V12, a sua IgE total é de 95 ng/mL e apresentou EAST positiva para *D. glomerata* e *P. hybrida*. Foi possível identificar reatividade aos alérgenos identificados como Dac g 1, Dac g 4, Dac g 5, Dac g 13, Pla a 2 e Pla TLP. De fato, a

informação molecular é consistente com a sintomatologia alérgica, sendo provável que ocorra também na primavera, apesar de este indivíduo não a ter identificado.

O resto dos soros testados por *immunoblotting* pertencem a indivíduos que responderam negativamente às perguntas-chave. No caso dos indivíduos V6, V11, V18, V22 e V23, a sua IgE total é elevada (158, 179, 319, 106 e 114 ng/mL, respetivamente). Destes, o V6, o V11, o V18 e o V22 apresentam EAST positiva para *D. glomerata* e reatividade aos alérgenos identificados Dac g 1, Dac g 5 e Dac g 13. Apenas o V6 e o V18 reagem ao Dac g 4. O indivíduo V23 tem EAST negativa para *D. glomerata* e não foi testado em *immunoblotting*, contudo, apresentou EAST positiva para *Q. rotundifolia* e foi possível identificar bandas imunorreativas a esta espécie. Os soros dos indivíduos V18 e V22 foram testados por *Immunoblotting* às três espécies. Relativamente a *Q. rotundifolia*, ambos apresentam EAST positiva e bandas imunorreativas a esta espécie. Relativamente a *P. hybrida*, o V22 apresenta EAST positiva, detetam-se os alérgenos Pla a 2 e Pla TLP e outras bandas imunorreativas que são fracamente inibidas por extrato de *D. glomerata*. No V18, apesar de apresentar EAST negativa a *P. hybrida*, detetam-se igualmente o Pla a 2 e o Pla TLP, bem como outras bandas imunorreativas, que sofrem uma inibição forte por extrato de *D. glomerata*, sugerindo reatividade cruzada entre as duas espécies. No seu conjunto, estes indivíduos são sensibilizados a pelos menos uma das espécies testadas, sendo assintomáticos ou, se alérgicos, não reconhecem a sintomatologia.

Os indivíduos V7, V19, V25 e V37 têm IgE total inferior a 40 ng/mL. Destes apenas o V7 apresenta EAST positiva a *D. glomerata*, com reatividade a Dac g1, Dac g 5 e Dac g 13. Os restantes apresentam reatividade também a estes alérgenos, com exceção do V19, onde não se detetam os alérgenos major, sendo que este indivíduo é o que apresenta o valor de IgE total mais baixo (11 ng/mL). O V7 apresenta ainda EAST positiva a *P. hybrida*, com reatividade a Pla a 2 e Pla TLP. O V25 apresenta EAST positiva para *Q. rotundifolia* com bandas imunorreativas a esta espécie. Apesar da sensibilização a algumas destas espécies detetada na utilização das técnicas moleculares, é possível que estes indivíduos não apresentem sintomatologia alérgica pólenes.

Quanto aos casos que apresentaram EAST negativa (V19 e V37 para *D. glomerata* e V2, V18 e V51 para *P. hybrida*) mas apresentaram bandas imunorreativas nos *immunoblottings*, estes casos sugerem o fato de a proteína no *Immunoblotting* estar no estado desnaturado, alterando a sua conformação e os epítomos assim estarem mais expostos a ligação.

Estes resultados sublinham a importância de, no estudo da doença alérgica, ser relevante poder contar com a avaliação a diferentes níveis, desde o sintomatológico ao molecular.

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliada uma população jovem universitária relativamente à possibilidade de sofrerem de polinose. Para tal foi utilizada uma escala, onde foi útil para identificar a população de risco, dividindo assim a população em dois grupos. Isto confirmou-se pela medição de IgE total onde se verificou que o grupo de risco possuía uma média de valores de IgE mais elevada que o outro grupo.

Foi testada a sensibilização a *D. glomerata*, a *Q. rotundifolia* e *P. hybrida* por EAST em 38, 23 e 21 indivíduos, respetivamente. Os resultados mostram que 45% dos indivíduos testados apresentaram sensibilização a *D. glomerata*, 30% a *Q. rotundifolia* e 29% a *P. hybrida*. Tendo em conta os indivíduos testados relativamente às três espécies (21 indivíduos), 81% destes apresentam sensibilização a pelo menos uma delas, 24% são sensibilizados a duas e apenas 5% apresenta sensibilização às três espécies.

Os resultados do *immunoblotting* também sugeriram a presença de alergénios já identificados no pólen de dácila e plátano e sugerem também a possível existência de alergénios para a espécie *Quercus rotundifolia*. Estes resultados também sugerem a existência de reatividade cruzada entre as gramíneas e a azinheira e as gramíneas e o plátano.

Em suma, o conjunto de todos os resultados permite sugerir a existência de sensibilização a estas três espécies, que são muito abundantes na região do Alentejo. Assim sendo, os resultados são sugestivos da ocorrência dos sintomas de alergia respiratória pré-sazonais à época polínica das gramíneas e também que, devido ao elevado grau de exposição a pólen de plátano e de azinheira, possam causar o aumento de polinose na região de Évora.

## 7. REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2016). Introduction to the Immune System. In *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System* (5th Editio, pp. 1–25). Elsevier.
- Akdis, C. A. (2014). The underlying mechanisms in allergy. In *Global Atlas of Allergy* (pp. 39–42). European Academy of Allergy and Clinical Immunology.
- Alcázar, P., Cariñanos, P., De Castro, C., Guerra, F., Moreno, C., Domínguez-Vilches, E., & Galán, C. (2004). Airborne plane-tree (*Platanus hispanica*) pollen distribution in the city of Córdoba, South-western Spain, and possible implications on pollen allergy. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, *14*(3), 238–243.
- Antunes, C. M., Candeias, J., Anacleto, S., R., A., Calhau, I., Costa, A. R., ... L., L. (2016). Allergenic profile of *Quercus rotundifolia* pollen in Alentejo, Portugal. *Allergy*, *71*, 213–214.
- Arosa, F. A. (2007). O Complexo Major de Histocompatibilidade. In *Fundamentos de Imunologia* (pp. 63–79). LIDEL.
- Asero, R., Mistrello, G., Amato, S., & Villalta, D. (2012). Monosensitization to a novel plane pollen allergen. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, *44*(4), 167–169.
- Asturias, J. A., Ibarrola, I., Bartolomé, B., Ojeda, I., Malet, A., & Martínez, A. (2002). Purification and characterization of Pla a 1, a major allergen from *Platanus acerifolia* pollen. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *57*(3), 221–227. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2002.03406.x>
- Baldacci, S., Maio, S., Cerrai, S., Sarno, G., Baiz, N., Simoni, M., ... Viegi, G. (2015). Allergy and asthma: Effects of the exposure to particulate matter and biological allergens. *Respiratory Medicine*, *109*(9), 1089–1104. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2015.05.017>
- Barata, L. T. (2007). Alergias. In *Fundamentos de Imunologia* (pp. 357–276). LIDEL.
- Barderas, R., Villalba, M., & Rodríguez, R. (2004). Recombinant expression, purification and cross-reactivity of chenopod profilin: rChe a 2 as a good marker for profilin sensitization. *Biological Chemistry*, *385*(8), 731–737. <https://doi.org/10.1515/BC.2004.089>
- Batard, T., Basuyaux, B., Lambin, P., Brémard-Oury, C., Hamilton, R., David, B., & Peltre, G. (1993). Isotypic analysis of grass pollen-specific immunoglobulins in human plasma. 1. Specialization of certain classes and subclasses in the immune response. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, *100*(1), 68–

- Behrendt, H., & Becker, W. M. (2001). Localization, release and bioavailability of pollen allergens: The influence of environmental factors. *Current Opinion in Immunology*, 13(6), 709–715. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(01\)00283-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00283-7)
- Buters, J. (2014). Pollen allergens and geographical factors. In *Global Atlas of Allergy* (pp. 36–38). European Academy of Allergy and Clinical Immunology.
- Caeiro, E., Brandão, R., Carmo, S., Lopes, L., Almeida, M. M. de, Gaspar, Â., ... Nunes, C. (2007). Rede Portuguesa de Aerobiologia : Resultados da monitorização do pólen. *Rev Port Imunoalergologia*, 15(December 2015), 235–250.
- Caeiro, E., Camacho, I. C., Lopes, L., Gaspar, Â., Todo-Bom, A., Oliveira, J. F. de, ... Morais-Almeida, M. (2014). Análise das concentrações de pólen de gramíneas na atmosfera de Portugal Continental. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 125–138.
- Cardoso, E. M. (2007). Células e Órgãos do Sistema Imunológico. In *Fundamentos de Imunologia* (pp. 19–34). LIDEL.
- Costa, A. R., Arriegas, R., Galveias, A., Ramos, I., Calhau, I., Lopes, L., & Antunes, C. M. (2016). Study of the allergenic profile of pollen from *Platanus hybrida* in the city of Evora, Portugal. *Allergy*, 71, 470.
- Cota, A. M., & Midwinter, M. J. (2015). The immune system. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 16(7), 353–355. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2015.04.006>
- D'Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., ... Van Cauwenberge, P. (2007). Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 62(9), 976–990. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01393.x>
- Egger, C., Focke, M., Bircher, A. J., Scherer, K., Mothes-Luksch, N., Horak, F., & Valenta, R. (2008). The allergen profile of beech and oak pollen. *Clinical and Experimental Allergy*, 38(10), 1688–1696. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03092.x>
- Grote, M., Swoboda, I., Valenta, R., & Reichelt, R. (2005). Group 13 allergens as environmental and immunological markers for grass pollen allergy: Studies by immunogold field emission scanning and transmission electron microscopy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 136(4), 303–310. <https://doi.org/10.1159/000083975>
- Guérin-Marchand, C., & Sénéchal, H. (1996). Cloning, Sequencing and Immunological characterization of Dac g

3, a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen. *Molecular Immunology*, 33(9), 797–806.

Kindt, Goldsby, O. (2007a). Hypersensitivity Reactions. In *Kuby Immunology* (6ª edição, pp. 371–400).

Kindt, Goldsby, O. (2007b). The major histocompatibility complex and antigen presentation. In *Kuby Immunology* (6ª edição, pp. 189–222).

Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007a). Cells and Organs of the Immune System. In *Kuby Immunology* (6ª edição, pp. 23–51).

Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007b). Cytokines. In *Kuby Immunology* (6ª edição, pp. 302–326).

Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007c). Overview of the Immune System. In *Kuby Immunology* (6ª edição, pp. 1–21).

Kleine-Tebbe, J., & Davies, J. (2014). Grass pollen allergens. In *Global Atlas of Allergy* (pp. 22–24). European Academy of Allergy and Clinical Immunology.

Klysner, S., Welinder, K., Løwenstein, H., & Matthiesen, F. (1992). Group V allergens in grass pollens: IV. Similarities in amino acid compositions and NH<sub>2</sub>-terminal sequences of the group V allergens from *Lolium perenne*, *Poa pratensis* and *Dactylis glomerata*. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society of Allergy and Clinical Immunology*, 22(4), 491–7.

Lauer, I., Miguel-Moncin, M. S., Abel, T., Foetisch, K., Hartz, C., Fortunato, D., ... Scheurer, S. (2007). Identification of a plane pollen lipid transfer protein (Pla a 3) and its immunological relation to the peach lipid-transfer protein, Pru p 3. *Clinical and Experimental Allergy*, 37(2), 261–269. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02653.x>

Lopez, V. B., García de la Barrena, E. H., & Sastre, J. (2016). Relevance of Clinical Sensitization to *Quercus* Pollen in Spain? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(2), AB122. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.528>

Lorenz, A. R., Lütkopf, D., May, S., Scheurer, S., & Vieths, S. (2008). The principle of homologous groups in regulatory affairs of allergen products - A proposal. *International Archives of Allergy and Immunology*, 148(1), 1–17. <https://doi.org/10.1159/000151243>

Mecheri, S., Peltre, G., & David, B. (1985). Purification and characterization of a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen: the Ag Dg1. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*.

Morais-Almeida, M., Loureiro, C., Todo-bom, A., Nunes, C., & Pereira, C. (2005). Avaliação da prevalência e caracterização da rinite em utentes dos cuidados de saúde primários de Portugal Continental - estudo

ARPA. *Revista Portuguesa Imunoalergologia*, 13(1), 69–80.

- Niederberger, V., Pauli, G., Grönlund, H., Fröschl, R., Rumpold, H., Kraft, D., ... Spitzauer, S. (1998). Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBet v 2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel, and oak pollen: a quantitative IgE inhibition study with sera from different populations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 570–591.
- O'Connor, C., & Nichol, A. (2015). Inflammation, immunity and allergy. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 16(7), 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2015.05.001>
- ONDR. (2017). *Observatório Nacional das Doenças Respiratórias*. <https://doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201>
- Palacín, A., Rivas, L. A., Gómez-Casado, C., Aguirre, J., Tordesillas, L., Bartra, J., ... Díaz-Perales, A. (2012). The Involvement of Thaumatin-Like Proteins in Plant Food Cross-Reactivity: A Multicenter Study Using a Specific Protein Microarray. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044088>
- Parkin, J. and Cohen, B. (2001). Overview of the Immune System. *The Lancet*, 357(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Petersen, A., Suck, R., Hagen, S., Cromwell, O., Fiebig, H., & Becker, W. M. (2001). Group 13 grass allergens: Structural variability between different grass species and analysis of proteolytic stability. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(5 SUPPL.), 856–862. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.114114>
- Prados, M., Aragon, R., Carranco, M. I., Martinez, A., & Martinez, J. (1995). Assessment of sensitization to holm oak (*Quercus ilex*) pollen in the Mérida area (Spain). *Allergy*, 50(5), 456–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7573837>
- Quintas, A., Freire, A. P., & Halpern, M. J. (2008). *Bioquímica - Organização molecular da vida*.
- Radauer, C., & Breiteneder, H. (2006). Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(1), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.09.010>
- Ring, J. (2014). What is Allergy. In *Global Atlas of Allergy* (pp. 2–3). European Academy of Allergy and Clinical Immunology.
- Roberts, A. M., Van Ree, R., Cardy, S. M., Bevan, L. J., & Walker, M. R. C.-1421683. (1992). Recombinant pollen allergens from *Dactylis glomerata*: preliminary evidence that human IgE cross-reactivity between Dac g II and Lol p I/II is increased following grass pollen immunotherapy. *Immunology*, 76(3), 389–396. Retrieved

from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1526648>  
eng%5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1526648>

LA

-

- Schroeder, H. W., Cavacini, L., Schroeder Jr., H. W., Cavacini, L., Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 Suppl 2), S41-52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Shamji, M. H., & Durham, S. R. (2017). Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *140*(6), 1485–1498. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.010>
- Swoboda, I., Grote, M., Verdino, P., Keller, W., Singh, M. B., De Weerd, N., ... Spitzauer, S. (2004). Molecular Characterization of Polygalacturonases as Grass Pollen-Specific Marker Allergens: Expulsion from Pollen via Submicronic Respirable Particles. *The Journal of Immunology*, *172*(10), 6490–6500. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.10.6490>
- Teno, P. A., & Vilches, E. D. (2007). *Spanish aerobiology network (rea): management and quality manual 1*.
- Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T., & Behrendt, H. (2009). Determinants of allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *123*(3), 558–566. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.12.003>
- Turgeon, M. L. (2014). Antigenes and Antibodies. In *Immunology & Serology in Laboratory Medicine* (5ª edição, pp. 10–29). Elsevier.
- Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 SUPPL. 2), S24–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>
- Van Oort, E., De Heer, P. G., Dieker, M., Van Leeuwen, A. W., Aalberse, R. C., & Van Ree, R. (2004). Characterization of natural Dac g 1 variants: An alternative to recombinant group 1 allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *114*(5), 1124–1130. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.06.050>
- Vieths, S. (1997). Allergenic cross-reactivity, food allergy and pollen. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *4*(1–2), 61–70. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(97\)10043-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(97)10043-6)
- Voller, A., Bidwell, D. E., & Bartlett, A. (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bulletin of the World Health Organization*, *53*(1), 55–65. <https://doi.org/PMC2366417>

## **Websites consultados**

[1] [https://en.wikipedia.org/wiki/Immunoglobulin\\_E](https://en.wikipedia.org/wiki/Immunoglobulin_E) (acedido a 24 de setembro de 2018)

[2] [lince.di.uevora.pt/polen/](https://lince.di.uevora.pt/polen/) (acedido a 23 de setembro de 2018)

[3] [allergen.org](https://allergen.org) (acedido a 26 de setembro de 2018)

[4] [jb.utad.pt](https://jb.utad.pt) (acedido a 29 de setembro de 2018)

[5] [allergome.org](https://allergome.org) (acedido a 28 de setembro de 2018)

[6] [flora.on](https://flora.on) (acedido a 28 de setembro de 2018)

# ANEXOS

## Anexo 1: Questionário

**Pergunta 1:** Regularmente, consome bebidas alcoólicas?

**Pergunta 2:** É fumador?

**Pergunta 3:** Apresenta alguma doença relativa ao sistema imunológico? Se sim, refira a doença

**Pergunta 4:** Pratica atividade física regularmente?

**Pergunta 5:** Apresenta alguma alergia? Se sim, especifique.

**Pergunta 6:** Atualmente ou regularmente, toma antibióticos?

**Pergunta 7:** É diabético?

**Pergunta 8:** Apresenta-se frequentemente constipado entre os meses de março e junho?

## Anexo 2: Soluções

<b>EAST</b>
<b>PBS</b> (NaCl 136,9 mM, KCl 2,7 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O 2,67 Mm KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,8 mM)
Para 500 mL de solução pesar <ul style="list-style-type: none"><li>✓ 4 g de NaCl</li><li>✓ 0,1 g de KCl</li><li>✓ 1,3535 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O</li><li>✓ 0,1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li></ul>
<b>Tampão de Incubação</b> (0,3% BSA 0,1% Tween-20 em PBS)
Para 15 ml pesar 0,045 g de BSA e 15 µL de Tween-20
<b>Tampão de Lavagem</b> (0,5% Tween-20)
Para 200 ml adicionar 1 mL de Tween-20

<b>SDS-PAGE</b>
<b>Acrilamida/Bis (30% T; 2,26% C)</b>
Para 300 mL de água destilada: <ul style="list-style-type: none"><li>✓ 87,6 g de acrilamida</li><li>✓ 2,44 g de N,N-bis-metileno-acrilamida</li></ul> Filtrar a solução e armazenar no escuro a 4°C até um máximo de 30 dias
<b>SDS 10% (p/v)</b>
Dissolver 10 g de SDS em 90 mL de água, com agitação suave. Perfazer o volume até 100 mL. Guardar a solução à temperatura ambiente até um máximo de 6 meses.
<b>Tris-HCl 1,5M, pH 8,8</b>
Dissolver 18,15 g de Tris em 60 mL de água destilada. Ajustar a pH 8,8 com HCl e perfazer o volume até 100 mL. Guardar a solução no escuro a 4°C até um máximo de 3 meses.
<b>Tris-HCl 0,5M, pH 6,8</b>
Dissolver 6 g de Tris em 60 mL de água destilada. Ajustar a pH 6,8 com HCl e perfazer o volume até 100 mL. Guardar a solução no escuro a 4°C até um máximo de 3 meses.
<b>Tris-HCl 1,5M, pH 6,8</b>
Dissolver 18,15 g de Tris em 60 mL de água destilada. Ajustar a pH 6,8 com HCl e perfazer o volume até 100 mL. Guardar a solução no escuro a 4°C até um máximo de 3 meses.

<b>Tampão da amostra 6x</b> (Tris-HCl 300 mM, pH 6,8; SDS 12%; Glicerol 30%; Azul de bromofenol 0,06%; DTT 600 mM)
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 3 mL de glicerol</li> <li>✓ 1 mL de Tris-HCl</li> <li>✓ 0,6 g de SDS</li> <li>✓ 0,4625 g de DTT</li> <li>✓ 0,003 g de azul de bromofenol</li> </ul> <p>Adicionar água destilada até perfazer 5 mL. Armazenar em alíquotas e guardar a -20°C até um máximo de 6 meses.</p>
<b>Tampão de corrida 5X</b> (Tris-HCl 125 mM, pH 8,3; Glicina 0,96%; SDS 0,5%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 15,14 g de Tris base</li> <li>✓ 72,06 g de glicina</li> <li>✓ 5 g de SDS</li> </ul> <p>Dissolver e perfazer até 1 L com água desionizada. Não ajustar o pH com ácido ou base. Guardar a 4°C. Se ocorrer precipitação, coloca-lo à temperatura ambiente antes de utilizar.</p>
<b>APS (10%)</b>
Preparar na hora a utilizar. Dissolver 100 mg de APS em 1 mL de água desionizada.
<b>Solução corante Coomassie</b> (MeOH 30% (v/v), Ácido acético 10% (v/v), Coomassie 0,5% (m/v))
<p>Para 1 L se solução adicionar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 450 mL de MeOH</li> <li>✓ 100 mL de ácido acético</li> <li>✓ 5 g de Coomassie Brilliant Blue</li> </ul> <p>Filtrar a solução e armazená-la, protegida da luz, á temperatura ambiente.</p>
<b>Solução descorante</b> (MeOH 30% (v/v), Ácido acético 10% (v/v))
<p>Para 1 L de solução adicionar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 300 mL de MeOH</li> <li>✓ 100 mL de ácido acético</li> </ul> <p>Guardar à temperatura ambiente.</p>

<b>Immunoblotting</b>
<b>Tampão de Transferência</b> (Tris 25 mM pH 8,3, Glicina 192 mM, MeOH 20%, 0,037% SDS)
Para 1 L de solução adicionar: <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 3,03 g de Tris</li> <li>✓ 14,4 g de glicina</li> <li>✓ 200 mL de metanol</li> <li>✓ 0,36 g de SDS ou 3,7 mL de SDS 10%</li> </ul> <p>Não adicionar ácido ou base para ajustar o pH.</p>
<b>Ponceau S</b> (0,2%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 0,2% de Ponceau</li> <li>✓ 3% de ácido acético</li> </ul>
<b>TBS 10X</b> (Tris-HCl 250 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,6)
Para 1 L de solução adicionar: <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 30,28 g de Tris</li> <li>✓ 87,66 g de NaCl</li> </ul> <p>Acertar o pH e guardar a 4° C.</p>
<b>TBST 1X</b> (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6)
Diluir 100 mL em água destilada, até perfazer o volume de 1L. Adicionar 1 mL de Tween-20.

## Anexo 3: Equipamentos

- |   |   |
|---|---|
| ✓ Agitador Magnético                                      | ✓ Balança analítica (Metler HK 160)                                     |
| ✓ Banho seco  | ✓ Banho termostatzado a 55°C com agitação                               |
| ✓ Bio-Rad Gel doc (sistema)                               | ✓ Centrífuga de bancada (spin)  |
| ✓ Congelador  | ✓ Espectrofotômetro UV-visível (Hitachi)                                |
| ✓ Frigorífico   | ✓ Medidor de pH   |
| ✓ Sistema de eletroforese Mini-Protean-3 da Bio-Rad (USA) | ✓ Sistema Mini Trans-Blot Electroforetic Transfer Cell da Bio-Rad (USA) |
| ✓ Sistema de IEF Model 111 Mini IEF Cell da Bio-Rad (USA) | ✓   |