



ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

***“ESTUDO PARA O DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PHL P 5  
EM AMOSTRAS DE AR ATMOSFÉRICO COLHIDAS NA CIDADE DE ÉVORA”***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RITA MENDES RIBEIRO

5118

ORIENTADOR (ES):

PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> CÉLIA ANTUNES

PROF. DR. RUI BRANDÃO

ÉVORA

2011



ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

***“ESTUDO PARA O DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PHL P 5  
EM AMOSTRAS DE AR ATMOSFÉRICO COLHIDAS NA CIDADE DE ÉVORA”***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RITA MENDES RIBEIRO

5118

ORIENTADOR (ES):

PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> CÉLIA ANTUNES

PROF. DR. RUI BRANDÃO

ÉVORA

2011



## **Índice**

## Índice

Índice de Figuras.....	6
Índice de Quadros.....	8
Abreviaturas.....	10
Aerobiologia e Bioquímica.....	20
1.    Bioaerossóis: Caracterização e Impacto para a Saúde.....	20
1.1.    Composição dos Bioaerossóis.....	20
1.2.    Caracterização Geral dos alergenos.....	21
1.3.    Caracterização dos aeroalergenos.....	22
1.4.    As alergias respiratórias.....	22
1.4.1.    Caracterização das imunoglobulinas.....	23
2.    O Pólen e as polinoses.....	24
2.1 As polinoses na Europa – Península Ibérica.....	25
2.1.1    Constituição e função do pólen.....	25
2.2    Dimensão versus Polinização.....	27
3.    Técnicas de captação e quantificação de bioaerossóis.....	30
4.    Principais métodos de colheita de bioaerossóis.....	31
2. Material e Métodos.....	33
2.1. Reagentes e Soluções.....	33
2.2. Recolha bioaerossóis.....	33
2.2.1. Captação do pólen.....	33
2.2.2. Captação de aeroalergenos.....	34
2.3. Preparação dos filtros para recolha das amostras de aeroalergenos.....	35
2.4. Procedimento para a extracção dos filtros.....	35
2.5. Quantificação do alergeno <i>Phl p 5</i> .....	36
5. Resultados e Discussão.....	41
5.1 Estabelecimento de um método ELISA para <i>Phl p 5</i> .....	41
5.2 Alteração das condições de extracção.....	45
5.3 Conteúdo em alergeno <i>Phl p 5</i> contido nos filtros.....	46
5.4. Estudo de correlação entre o conteúdo em aeroalergeno e pólen.....	48
6. Conclusões.....	50
7. Bibliografia.....	52

## **Índice de Figuras**

Figura 1- Estrutura básica da molécula de anticorpo, detalhe da região de ligação ao antigénio. ....	23
Figura 2 Diagrama esquemático de uma Imunoglobulina .....	24
Figura 3: Grãos de pólen de Poaceae (adaptado de Camacho, 2007) .....	27
Figura 4 Colector de partículas, Chemvol Sampler localizado na plataforma meteorológica situada na Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Évora, a 17m do solo .....	34
Figura 5: Filtro XL colocado numa das campânulas que constitui o colector ..	34
Figura 6: Filtro M colocado numa das campânulas que constitui o colector ....	34
Figura 7: Esquema ilustrativo do método ELISA utilizado para quantificação do alérgeno .....	37
Figura 8: Curva de calibração para Phl p 5 representativa de 14 ensaios realizados .....	42
Figura 9: Variação da concentração dos controlos positivos nos ensaios realizados .....	43
Figura 10: Variação da concentração da amostra teste para os diferentes ensaios .....	44
Figura 11: Curva de diluição da amostra teste para Phl p5 representativa dos 14 ensaios realizados .....	45
Figura 12: Extracção de amostras com tampão bicarbonato suplementado com BSA ou com Triton e Extracção de amostras com tampão fosfato suplementado com BSA ou Triton .....	46
Figura 13: a )Quantificação do alérgeno Phl p 5 contido nos filtros XL e M. O conteúdo em alérgeno retido nos filtros XL e M baseia-se na dimensão das partículas presentes no ar b) Relação entre a percentagem de alérgeno retido no filtro XL e no filtro M .....	47
Figura 14: Expressão polínica de pólen Phleum pratense vs quantidade de alérgeno Phl p 5 presente nos filtros XL e M. Os valores apresentados representam o nº de grãos de pólen obtidos durante a época polínica através do método Hirst, e quantidade de alérgeno que foi determinada nos filtros XL e M utilizando o método ELISA .....	48

Figura 15: Correlação: Contagem polínica vs [Phl p5] pg/m3 Filtro XL + Filtro M.  
O número de grãos de pólen obtidos pela contagem através do método Hirst relaciona-se com a quantidade de alérgeno obtido por ELISA..... 49

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1:</b>	Características do pólen Poaceae.....	26
<b>Quadro 2:</b>	Caracterização das isoformas de <i>Phleum pratense</i> .....	28
<b>Quadro 3:</b>	Variação da concentração dos controlos positivos nos ensaios realizados.....	43

## **Abreviaturas**

## Abreviaturas

<b>Abreviatura, acrónimos e unidades</b>	<b>Significado</b>
a.a	Aminoácido
Ab	Anticorpo, do inglês “Antibody”
Ag	Antigénio, do inglês “Antigen”
BSA	Albumina do soro bovino, do inglês “Bovine serum albumine”
°C	Graus Celcius
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
EIA	Imunoensaio enzimático
ELISA	Imunoensaio Enzimático, do inglês “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
Ig	Imunoglobulinas
kDa	Kilo Dalton
NK cells	Células natural <i>killer</i> , do inglês “Natural Killer cells”
P	Partículas
PCR	Reacção em cadeia pela Polimerase, do inglês “Protein Chain Reaction”
Phl	Fracção de proteínas do Phleum
RIA	Radio imunoensaio
rpm	Rotações por minuto

## **Agradecimentos**

O meu primeiro agradecimento vai para a Exma. Prof.<sup>a</sup> Dra. Célia Maria Miguel Antunes do Departamento de Química da Universidade de Évora, por ter aceite ser minha orientadora, por todo o conhecimento e auxílio concedido, e ter tornado possível a realização deste trabalho.

Para Exmo. Prof. Dr. Rui Brandão, do Departamento de Biologia da Universidade de Évora, por ter aceite ser meu co-Orientador, por todo o seu apoio.

À Raquel, por ter dividido comigo as tarefas no laboratório.

À Dr.<sup>a</sup> Elsa Caeiro por toda a ajuda e simpatia.

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

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

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

Aos meus pais um agradecimento especial porque sem eles o meu percurso académico não seria possível. Por todo o carinho e apoio incondicional. Ao meu irmão, José, pelo carinho, amizade e incentivo.

À minha família pelo carinho e apoio que me deram.

Aos meus amigos que longe ou perto sempre estiveram presentes e se preocuparam comigo.

**Resumo**

Rita Mendes Ribeiro (2011). **ESTUDO PARA O DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE *PHL P 5* EM AMOSTRAS DE AR ATMOSFÉRICO COLHIDAS NA CIDADE DE ÉVORA.** Dissertação de Mestrado (C.M. Antunes e R. Brandão, orientadores). Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

O *Phl p 5* é um alergeno major do grupo V dominante no pólen da espécie *Phleum pratense*, que contribuí para o agravamento das doenças alérgico-respiratórias durante a estação polínica. Porém, não estão estabelecidos métodos para que permitam quantificar os aeroalergenos.

O objectivo deste trabalho foi desenvolver e implementar metodologias para quantificar o *Phl p 5* em amostras de ar exterior captado em Évora.

Os pólenes e o alergeno foram colhidos utilizando colectores do tipo Hirst, e de impacto (Chemvol), respectivamente. A quantificação do alergeno efectuou-se por ELISA.

Dos tampões de extracção testados, o tampão  $\text{HCO}_3\text{NH}_4$  contendo BSA foi o mais adequado para extrair o aeroalergeno. Estabeleceu-se um método fiável para determinação de *Phl p 5*. Em 2009, o perfil de distribuição temporal do aeroalergeno acompanhou o perfil de distribuição polínico de gramíneas, registando-se uma correlação entre os conteúdos em alergeno e pólen, indicando que o alergeno é transportado pelos grãos de pólen.

**Abstract**

Rita Mendes Ribeiro (2011). **STUDY FOR THE DEVELOPMENT OF METHODS FOR QUANTIFICATION OF *PHL P 5* IN SAMPLES OF ATMOSPHERIC AIR COLECTED IN ÉVORA.** Master Disertation (C.M. Antunes e R. Brandão, supervisors). Science and Technology School, University of Évora, Évora, Portugal.

The *Phl p 5* is a major allergen of group V and dominant in pollen of *Phleum pratense* and so it aggravates allergic and respiratory diseases resulting from pollen exposure. Presently, there are no feasible methodologies to determine *Phl p 5* aeroallergen in outdoor air samples.

Pollen particles were collected through a Hirst-type volumetric air sampler and the aeroallergens were collected using an impact collector Chemvol. After extraction, the quantification of *Phl p 5* was performed using an ELISA method. Several buffer systems were tested for extraction of the allergen content and  $\text{HCO}_3\text{NH}_4$  buffer with BSA was the best for the quantification of *Phl p 5*. Firstly, a feasible method for *Phl p 5* determinations in air samples was established. In 2009 pollen season, the allergen profile followed the pollen profile and a positive correlation between the air content of the two parameters was found, suggesting that *Phl p 5* is associated to the pollen grains.

## **Objectivos**

### **Objectivo geral**

Desenvolver metodologias adequadas para monitorizar os níveis de aeroalergenos nas amostras de ar atmosférico recolhido na cidade de Évora.

### **Objectivos específicos**

1. Desenvolver um método imunológico ELISA para quantificação do alergeno, *Phl p 5*.
2. Estudar métodos de extracção da fracção proteica retida em filtros de colectores de impacto, mais especificamente do “High-Volume ChemVol® Cascade Impact”.
3. Identificação de fracções de bioaerossóis, nos quais se inclui o alergeno *Phl p 5*.
4. Avaliar a correlação do alergeno *Phl p 5* com as contagens polínicas referentes do pólen das gramíneas obtidas com um colector volumétrico tipo Hirst, mais especificamente o “Burkard Seven-Day Recording Volumetric Spore Trap®”.

## **Introdução**

## **Aerobiologia e Bioquímica**

A aerobiologia é a ciência que estuda as partículas de origem biológica transportadas de forma passiva no ar, a sua diversidade, modo de vida, e repercussão (Arias *et al.*, 2002). Um dos objectivos práticos da aerobiologia é o desenvolvimento de modelos estatísticos que permitam prever a concentração de pólenes na atmosfera possibilitando, assim, que os indivíduos alérgicos tomem medidas preventivas e de evicção durante a estação polínica (Rodríguez-Rajo, 2009).

A bioquímica, enquanto ciência analítica das unidades estruturais e básicas dos organismos e processos biológicos, pode dar uma grande contribuição para o desenvolvimento de metodologias que, por contribuírem para caracterizar os bioaerossóis, nomeadamente em aeroalergenos e, assim, contribuir para a prevenção da doença alérgica. Este trabalho em particular pretende ser um exemplo dessa contribuição, ao estabelecer métodos fiáveis para a análise e quantificação do alergeno *Phl p 5* em amostras de ar exterior, pelo método imunológico ELISA. Espera-se que no futuro, estas novas metodologias possam contribuir para uma mais eficiente previsão de risco de exposição aos vários factores etiológicos da alergia, vindo a melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

### **1. Bioaerossóis: Caracterização e Impacto para a Saúde**

#### **1.1. Composição dos Bioaerossóis**

Os bioaerossóis designam microrganismos, partículas ou fragmentos de natureza biológica, que existem no ar de forma passiva. Podem ser provenientes do solo, de plantas, ou mesmo de superfícies aquáticas (Camacho, 2007).

O ambiente atmosférico é propício para a dispersão biológica. A dimensão dos bioaerossóis tem implicações no período de tempo que estes se encontram aerosolizados, visto que as partículas de maiores dimensões têm tendência

para sedimentar. O seu tamanho varia normalmente  $\leq 0,1 \mu\text{m}$  e os  $200 \mu\text{m}$  de diâmetro (Camacho, 2007).

A dimensão dos bioaerossóis constitui uma característica importante, no que diz respeito ao seu impacto na saúde pública, porque as suas pequenas dimensões conferem-lhes a capacidade de penetrarem nas vias respiratórias, aderindo depois às mucosas que revestem os tecidos do sistema respiratório e não serem facilmente expelidos.

## **1.2. Caracterização Geral dos alergen**

O termo alergen foi vez usado pela primeira em 1903 por von Pirquet, para designar todas as substâncias estranhas que provocavam resposta imunológica. Subsequentemente, a palavra alergen tem sido usada, selectivamente, para proteínas que causam “hipersensibilidade”. Então, um alergen é um antigénio que desencadeia uma hipersensibilidade imediata (Male D. *et al.*, 2006).

Os alergen

Os alergen

Os alergen

### 1.3. Caracterização dos aeroalergenos

As três doenças alérgicas respiratórias de maior relevo - rinite alérgica, asma e dermatite atópica estão associadas à exposição aos aeroalergenos (Reid, 2009).

As alterações climáticas podem afectar a produção de aeroalergenos, influenciando a sua dispersão e distribuição, que, por sua vez, tem impacto na prevalência e severidade da doença alérgica (Reid, 2009).

Estudos aerodinâmicos sugerem que partículas do ar com diâmetro superior a 10 µm, como grãos de pólen alérgicos são suficientemente grandes para entrar em contacto com as vias aéreas e causar asma (Brito *et al.*, 2010).

### 1.4. As alergias respiratórias

O desenvolvimento da civilização, muitas vezes associado ao aumento da poluição, em detrimento do ambiente natural estimula o aparecimento de novos problemas de saúde, nomeadamente, das doenças alérgicas. Em todo o mundo, a alergia afecta cerca de 15-30% da população e a polinose cerca de 10 a 15% (Puc, 2003).

As alergias tipo I, nas quais se enquadram as polinoses, representam uma hipersensibilidade mediada por imunoglobulinas da classe E, como é o caso da rinoconjuntivite alérgica, asma alérgica, dermatite atópica, alergias alimentares e anafilaxia, que afectam cerca de 25% da população. Os sintomas da alergia são causados pelo reconhecimento de antígenos normalmente inócuos, como os alergenos, por anticorpos IgE, os quais induzem consecutivamente, a cascata de activação celular (Valenta, 2002).

Os sintomas da alergia do tipo I são consequência da secreção de mediadores como a histamina, resultado da activação celular subsequente à ligação cruzada das IgE específicos, os quais se ligam a células efectoras, alérgicas como basófilos e mastócitos (Steinberger, 1996).

Para se tornar um alérgeno, o antígeno deve conter pelo menos dois locais de ligação para IgE (epitopos de IgE) (Flicker, 2000).

Os epitopos que consistem numa cadeia de alguns aminoácidos são designados por “epitopos contínuos”. Os epitopos são compostos, pelo menos, por dois domínios não adjacentes da molécula, que estão em contacto, e da

molécula ligada, designam-se por “epitopos descontínuos”. Os epitopos IgE de alguns alérgenos relevantes, nomeadamente o alérgeno em estudo, *Phl p 5* são do tipo epitopo descontínuo (Hantusch, 2004).

### 1.4.1. Caracterização das imunoglobulinas

As imunoglobulinas (Ig), também designadas anticorpos naturais, são descritas como um componente do sistema imunitário inato. Anticorpo natural é definido como um anticorpo encontrado em indivíduos normais e saudáveis, que não evidenciem estimulação antigénica exógena (O’Gorman, 2008).

As Ig são caracterizadas segundo a sua estrutura e função. Fornecem um conjunto de receptores na célula B, permitindo que a célula produza uma grande diversidade de locais de ligação para os ligandos específicos. A interacção imunoglobulina - antígeno ocorre entre os paratopos (locais na Ig onde o antígeno se liga) e os epitopos (locais de ligação da molécula) (figura 1) (Akirav, *et al.*2008).

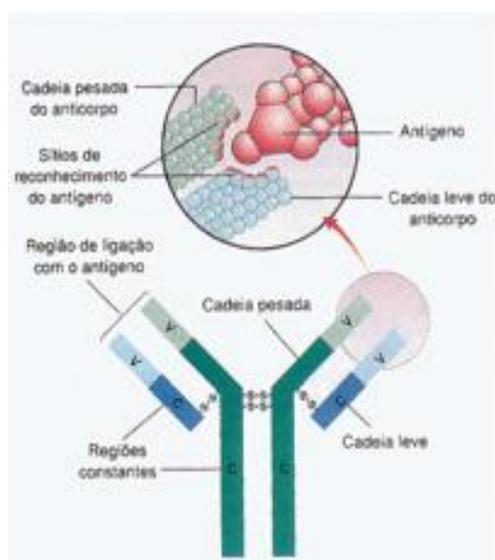


Figura 1- Estrutura básica da molécula de anticorpo, detalhe da região de ligação ao antígeno.

(<http://sindrome-asperger.dimensionebrasile.com/wp-content/uploads/2009/10/imunoglobulina-G.gif&imgrefur>)

Nos humanos distinguem-se cinco classes distintas de imunoglobulinas, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Diferem em:

✚ Tamanho;

- ✚ Carga;
- ✚ Sequência de aminoácidos;
- ✚ Conteúdo em glúcidos;
- ✚ Organização supramolecular

Os anticorpos têm uma estrutura geral similar, tendo em conta aspectos físico-químicos característicos, como é a carga e a solubilidade. A sua estrutura comum é composta por duas cadeias leves idênticas (cada uma com cerca de 24 kD), e duas cadeias pesadas (cerca de 55 a 70 kD) (figura 2).

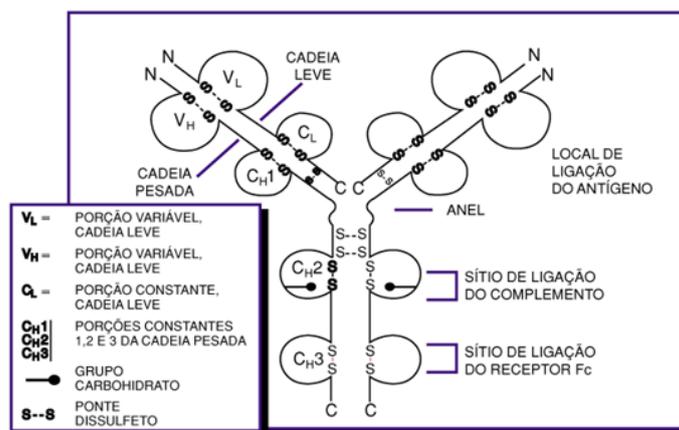


Figura 2 Diagrama esquemático de uma Imunoglobulina

(<http://www.pediatriasaopaulo.usp.br/upload/html/253/img/03f4.gif&imgrefurl>)

Uma cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada, e as duas cadeias pesadas estão ligadas uma à outra. As cadeias, leves e pesadas, contêm séries de repetições, unidades homólogas, cada uma com cerca de 110 resíduos de aminoácidos (a.a) de comprimento, que se ligam independentemente num arranjo globular comum, chamado domínio da imunoglobulina (Ig) (O’Gorman, 2008).

## 2. O Pólen e as polinoses

Os alérgenos do pólen, particularmente os de gramíneas e de certas árvores são considerados dos aeroalérgenos mais responsáveis por parte das doenças alérgicas do tracto respiratório (Puc, 2003).

As gramíneas são uma família muito importante de plantas, das quais fazem parte cerca de 650 a 700 géneros, existindo 12000 espécies distribuídas por todo o mundo (Arias *et al.*, 2002).

A família Poaceae está bem representada na Península Ibérica, sendo que os géneros que causam mais alergias são: Phleum spp., Dactylis spp., Lolium spp., Trisetum spp., Festuca spp., Poa spp., Cynodon spp., e Anthoxanthum spp. (García-Mozo, 2008).

## 2.1 As polinoses na Europa – Península Ibérica

As características climatológicas de cada região condicionam a presença ou ausência de diversas espécies botânicas e, conseqüentemente, a aerobiologia dos pólenes alergénicos.

Na Europa a polinose mais importante é devida à exposição e pólen de gramíneas e a Península Ibérica onde se encontra Portugal é caracterizada por um clima quente e temperado, favorável para esta família.

Na Europa, os pólenes pertencentes à família Poaceae são considerados como dos mais aeroalergénicos, provocando sintomas alérgicos em mais de 80% das pessoas sensibilizadas (Rodríguez-Rajo, 2009). A prevalência das doenças alérgico-respiratórias, nos países industrializados tem aumentado nas últimas décadas (Sázelová, 2004; Rodríguez-Rajo, 2009; Ribeiro, 2008).

### 2.1.1 Constituição e função do pólen

Os grãos de pólen são as estruturas onde se encontram os gâmetas das plantas com flor. Formam-se no interior dos estames e, uma vez maduros, são libertados. Têm como função alcançar a célula feminina da mesma espécie e fecundar o ovócito (Arias *et al.*, 2002).

Ao processo de transferência do pólen, desde o órgão onde se formou até à parte feminina da flor, chama-se polinização. A polinização pode efectuar-se de vários modos, dependendo das características das espécies (Arias *et al.*, 2002).

A dispersão dos grãos de pólen é tributária e do encargo de agentes de transporte, como o vento, a água e outros seres vivos. Uma simples corrente de ar assegura a dispersão de grãos de pólen de todas as Gimnospermas e de um grande número de Angiospermas, como é o caso de certas famílias de Gramíneas, Ciperáceas, Juncáceas, e de um determinado número de árvores

cujas flores são reunidas em aglomerados como as Betulaceas, as Populaceas e as Juglandáceas. Este modo de polinização demonima-se anemófila, enquanto que a polinização entomófila ocorre pela acção de insectos (Arias *et al.*, 2002; Renault-Mikovsky, 1990).

O processo de polinização exige que os grãos de pólen sejam constituídos por células envolvidos por uma parede especialmente resistente, visto serem submetidos a condições ambientais adversas, as quais poderiam provocar danos nos seus componentes celulares, alterando, assim, a viabilidade do pólen (Arias *et al.*, 2002).

Os grãos de pólen possuem duas paredes a intina, mais interna, de natureza pectocelulosica, e a exina, mais externa, composta por esporopolenina, uma substância lipídica fortemente resistente à degradação química, assim como por pequenas quantidades de polissacarídeos. A parede do grão de pólen confere-lhe protecção durante o transporte da antera ao estigma (Camacho, 2007).

Os grãos de pólen são caracterizados pela sua forma, tamanho, estrutura e escultura da exina, bem como pelas aberturas que podem apresentar (poros, colpos, a combinação de ambos ou a sua ausência) e ainda pelo seu número e disposição na superfície do grão (Arias *et al.*, 2002).

Quadro 1: Características do pólen Poaceae (adaptado de Camacho, 2007)

<b>Simetria e Forma</b>	Heteropolar, esferiodal
<b>Tamanho</b>	15 a 60 $\mu\text{m}$ e de 60 a 110 $\mu\text{m}$ de diâmetro
<b>Abertura</b>	Monoporado, poros bem definidos e circulares
<b>Ornamentação</b>	Grãos tectados, verrugosos, microverrugosos, rugulosos, escrâbicos ou psilados.
<b>Alergenecidade</b>	Relevância alérgica no início do Verão. É uma importante fonte de aeroalergenos já que desencadeia exacerbações de asma brônquica. Alergenecidade moderada a elevada.

A capacidade alergénica do pólen deve-se à aptidão que os grãos desse mesmo pólen têm de aderir às mucosas. Os estudos aerodinâmicos realizados indicam que as partículas superiores a 10  $\mu\text{m}$  ficam retidas nas vias respiratórias superiores (Sázelová, 2004).



Figura 3: Grãos de pólen de Poaceae (adaptado de Camacho, 2007)

## 2.2 Dimensão versus Polinização

A maioria dos pólenes apresenta tamanho compreendido entre 10 e 100  $\mu\text{m}$ , e a sua forma pode ser esférica ou ovóide, podendo ocorrer outras. A densidade e velocidade de sedimentação são diferentes para os vários tipos de pólen, sofrendo alterações na forma e tamanho, de acordo com o seu modo de polinização. Os grãos de pólen de tamanho pequeno, entre 20 a 40  $\mu\text{m}$  e com baixo teor em água, são geralmente distribuídos pelo vento a longas distâncias (Camacho, 2007).

## 2.3 Bioquímica do grão de pólen

A composição química do grão de pólen é variável entre as espécies. As percentagens dos componentes oscilam entre os 13-17% de glúcidos, 11-20 % de proteínas, 1-4% de lípidos e 1-2% de compostos inorgânicos. A quantidade de água é relativamente elevada quando o grão de pólen se encontra nas anteras, diminuindo bruscamente aquando da antese, tornando-se altamente higroscópico. No citoplasma, e na parede do grão de pólen encontram-se a maioria das proteínas, normalmente enzimas, que permitem o crescimento e

alongamento do tubo polínico e conseqüentemente a fecundação. Esta disposição, possibilita a interacção com o sistema imunitário (Camacho, 2007).

### 2.3.1. Características do *Phl p 5*

Estes alérgenos representam um enorme grupo variável de proteínas (Quadro 2), as quais podem ser distinguidas no pólen da erva-dos-prados (*timothy grass*) pelo seu peso molecular (Bufe, 1995).

Quadro 2: Caracterização do alérgeno *Phleum pratense*.

<b>Phleum pratense</b>	<b>Natureza e função</b>	<b>Massa molecular (kDa)</b>	<b>Prevalência das IgE específicas</b>	<b>Alergenicidade</b>
Phl p 1	B - expansina	31-35	90 %	Actividade alérgica forte
Phl p 2 e p 3	Ácida (2) Básica (3)	10-12	40-60 %	15 %
Phl p 4	Básica	50-57	80 %	20-40 %
Phl p 5	Actividade ribonuclease 2 isoformas “a” e “b”	27-33	65-85 %	50-95 %

Grande parte dos aerolergenos das gramíneas induz rinoconjuntivite ou asma brônquica em mais de 90% de indivíduos alérgicos a gramíneas e a aproximadamente 40% dos indivíduos com alergia Tipo I (Bufe, 1995). A severidade destes alérgenos está relacionada com o facto de estes poderem ser libertados dos grãos de pólen, no ambiente, sendo suficientemente pequenos para entrar nas vias respiratórias humanas e induzir uma resposta imediata de IgE em pacientes asmáticos (Bufe, 1995).

O *Phl p 5* representa um dos mais importantes alérgenos polínicos da erva-dos-prados (*timothy grass* - *Phleum pratense*) encontrando-se ligado a mais de 60% das IgE pólen-específicas no soro de pacientes alérgicos (Hantusch, 2004).

Existem duas isoformas naturais, *Phl p 5a* e *Phl p 5b*, as quais exibem sequência similar, diferindo ligeiramente na sua massa molecular e comportamento bioquímico (Hantusch, 2004). A isoforma *Phl p 5a* tem um peso molecular de 38 kDa, apresentando mais proteínas básicas, enquanto que a isoforma *Phl p 5b* contém mais proteínas ácidas, e o seu peso molecular é de 32 kDa (Bufe, 1995; Becker *et al.*, 1995).

No que diz respeito à função fisiológica das moléculas dos alergenos do grupo 5, pensa-se que podem desempenhar um papel importante no reconhecimento do grão de pólen pela superfície do estigma, no caso de incompatibilidade entre plantas heterólogas (Bufe, 1995).

#### **2.4 Factores climatéricos e os aeroalergenos**

As gramíneas são espécies anemófilas, pertencentes ao grupo das monocotiledóneas (subclasse *Liliidae*), cujo embrião tem apenas uma folha desenvolvida. A polinização realizada é favorecida por um determinado número de factores ambientais, como o vento (Arias *et al.*, 2002; Garcia-Mozo, 2008).

O desenvolvimento das gramíneas é positivamente influenciado pela disponibilidade de água, especialmente na região Mediterrânea. As elevadas temperaturas, o fotoperíodo e a baixa humidade relativa contribuem para um aumento dos níveis de pólen atmosférico de *Poaceae*, visto serem factores que condicionam o desenvolvimento e crescimento das plantas. Contudo, na floração existem outros factores climatéricos, como a chuva e a humidade relativa que induzem a libertação do pólen. Vários estudos demonstram uma relação entre os factores climatéricos/ambientais e as contagens de pólen atmosférico de gramíneas. Atendendo ao local onde são efectuadas as contagens polínicas, a temperatura parece ser o factor que exerce maior influência no início da época polínica das gramíneas, bem como da existência de picos de maior concentração de grãos de pólen. (García-Mozo, 2008)

As variações na produção de aeroalergenos, e subseqüentemente, a exposição humana, podem resultar em alterações na prevalência e severidade dos sintomas em indivíduos com doenças alérgicas (Reid *et al.*, 2009).

Para além disso, existe bibliografia que aponta para o facto do efeito dos alergénios do pólen ser amplificado por alguns tipos de poluição aérea, nomeadamente a carga das partículas finas e ultrafinas (Sázelová, 2004).

### **3. Técnicas de captação e quantificação de bioaerossóis**

A colheita de ar tem sido utilizada desde o século XIX, para examinar a composição atmosférica em bioaerossóis. As partículas de ar podem ser colectadas de forma passiva, pela gravidade, bem como por instrumentos específicos, em que a amostra é retirada activamente da atmosfera, através de impacto, filtração, ou de métodos que nos fornecem amostras volumétricas (Levetin, 2004).

O método mais simples e mais barato, mas menos preciso para colheita de amostras biológicas de ar é o uso da gravidade. Este método consiste em expor uma lâmina de microscópio ou placa de Petri revestida com agár, à amostra de ar interior ou exterior, por um determinado período de tempo. Pelo método da gravidade a recolha de amostra não quantitativa para as concentrações atmosféricas de aeroalergenos, é efectuada pela forma/tamanho das partículas, bem como pelo movimento de ar (Levetin, 2004).

Os instrumentos mais utilizados para amostragem de ar são os de impacto. Estes amostradores separam as partículas do fluxo de ar utilizando a inércia dessas mesmas partículas, o que provoca a sua deposição sobre uma superfície sólida, ou agár, onde o fluxo de ar se inclina para contornar a superfície. A deformação do fluxo de ar é conseguida em ambos os amostradores de impacto (pêndulos de sucção e de rotação). Os amostradores de fenda são muito utilizados para esporos fúngicos e pólen total. No caso dos pêndulos, as partículas são separadas do fluxo de ar através da inércia e depositadas num meio de recolha. O ar é extraído por uma bomba de vácuo, e as bolhas através da água, ou num tampão de diluição. As partículas do fluxo de ar, dispersas na amostra de ar fornecem informações sobre a composição dos bioaerossóis da atmosfera (Levetin, 2004).

#### 4. Principais métodos de colheita de bioaerossóis

Os principais métodos de colheita de amostras volumétricas de ar incluem impacto, gravidade e filtração. Vários instrumentos foram desenvolvidos com base nestes métodos de colheita. As amostras podem ser analisadas por diversos processos desde a microscopia, aos imunoenaios e ensaios moleculares. Contudo se a amostra for recolhida em meio líquido, este pode evaporar-se quando o período de recolha é mais longo (Levetin, 2004).

A filtração separa as partículas do fluxo de ar, e estas ficam aprisionadas num substrato fibroso ou poroso. Está disponível uma vasta gama de filtros para uso, desde 25 a 47 mm de diâmetro, dependendo do tipo de bioaerossóis. A eficácia da colheita é normalmente alta, depende do tamanho dos poros do filtro e da taxa de fluxo de ar (Levetin, 2004).

O Coriolis, colector de ar fabricado por Bertin Technologies (França), é um colector de ar contínuo, dedicado à monitorização de esporos fúngicos e grãos de pólen existentes no ar atmosférico. O ar é puxado para um tubo cónico com movimento giratório, usando a sucção. As partículas são empurradas contra a parede do tubo pela força centrífuga, são separadas do ar e colectadas num meio líquido. Esta solução permite a sua análise por várias técnicas, incluindo um ensaio Protein Chain Reaction (PCR), e testes sorológicos a fim de medir a alergenicidade/antigenicidade dos grãos de pólen e esporos fúngicos (Carvalho *et al.*, 2008; Gómez-Domenech *et al.*, 2010).

O Burkard trata-se de um pêndulo com fenda de sucção usado para colheita de pólen e esporos fúngicos. O primeiro colector deste tipo foi proposto por Hirst em 1952. No Burkard, o ar é puxado para um orifício de 14x2 mm a 10L/ min, as partículas são impactadas numa fita que fica abaixo do orifício. A superfície de impactação passa pelo orifício de 2 mm/hora, permitindo à amostragem uma discriminação do tempo. O orifício padrão no Burkard é eficiente para partículas até 3,7  $\mu\text{m}$  (Levetin, 2004).

O método de obtenção das amostras efectua-se consoante a finalidade do estudo, empregando um ou vários métodos de amostragem. Os aparelhos e dispositivos de captação podem ser de dois tipos: de deposição ou de impacto. Os de deposição baseiam-se na deposição gravitacional das partículas numa superfície horizontal que as retém, enquanto que nos de impacto, a

amostragem ocorre por impacto numa superfície sólida. Nos dias de hoje, os métodos de análise de bioaerossóis assentam no conceito de impacto (Camacho, 2007).

Neste trabalho a determinação da concentração atmosférica de grãos de pólen realizou-se com um equipamento desenvolvido por Hirst em 1952. Trata-se de um captador de sucção que se baseia no princípio do impacto, com um orifício através do qual passa a amostra de ar que colide numa superfície em movimento. As vantagens do Hirst sobre os outros tipos de captadores residem na maior eficiência de captação, autonomia de funcionamento de uma semana e controle do volume de ar aspirado. Para além disto, permite ainda a aplicação de métodos de contagens de biopartículas com uma fiabilidade considerável (Camacho, 2007).

O ChemVol é um colector de partículas, no qual o ar é aspirado por uma bomba que está ligada ao aparelho e que suga 800L/min. As partículas (P) presentes no ar são depositadas em dois filtros de acordo com as suas dimensões: XL,  $P > 10 \mu\text{m}$  e M,  $2,5 < P < 10 \mu\text{m}$  que se encontram no interior do aparelho. Estes são cortados em três partes iguais, e cada uma das partes é armazenada em tubos de polipropileno a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até à extracção (Buters *et al.* 2010).

#### **4.1 Quantificação de bioaerossóis utilizando imunoensaios**

Os imunoensaios são técnicas muito utilizadas em amostras de ar recolhidas por impacto, filtração ou ainda armadilha de esporos. Os imunoensaios envolvem a ligação de anticorpos ao antigénio de interesse. Os anticorpos monoclonais são geralmente os preferidos, devido à sua maior especificidade. A ligação ao anticorpo é detectada por um corante fluorescente, um enzima, ou resíduos radioactivos ligados ao anticorpo (Levetin, 2004).

Os imunoensaios apresentam inúmeras vantagens como a sensibilidade, especificidade e facilidade no seu uso, no entanto são economicamente dispendiosos (Levetin, 2004).

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Reagentes e Soluções**

Os reagentes utilizados para o método ELISA foram adquiridos às firmas Allergopharma, Bial e Sigma. Os restantes reagentes empregues foram adquiridos à Merck e Sigma.

### **2.2. Recolha bioaerossóis**

Neste trabalho foram utilizadas as amostras de bioaerossóis recolhidas na cidade de Évora, durante a época polínica de 2009. Foram colectados pólen e aeroalergenos recorrendo a metodologias distintas, como a seguir se descreve.

#### **2.2.1. Captação do pólen**

A determinação da concentração atmosférica de grãos de pólen realizou-se com um equipamento desenvolvido por Hirst em 1952 (descrito no capítulo 5.1 da Introdução). Este colector volumétrico encontrava-se na mesma plataforma meteorológica que o Chemvol, distando deste cerca de 2,5 m.

As contagens polínicas foram realizadas no laboratório de Palinologia e Aerobiologia, de acordo com a metodologia recomendada pela Associação Europeia de Aerobiologia e sob a responsabilidade da Dr.<sup>a</sup> Elsa Caeiro, investigadora no referido laboratório e técnica da Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica. Os dados foram cedidos pelo coordenador do grupo de interesse em aerobiologia da referida sociedade atendendo a tratarem-se de fins académicos.

### 2.2.2. Captação de aeroalergenos

As amostras de bioaerossóis, contendo o alergeno foram recolhidas utilizando um colector de partículas, High-Volume Chemvol Cascade Impact numa plataforma meteorológica, situada na Escola de Ciências e Tecnologia, no centro da cidade de Évora, a 17 m do solo e a 320 m acima do nível do mar.

Este trabalho iniciou-se com a recolha das amostras de ar, utilizando um colector de partículas o Chemvol (figura 4). Este colector encontrou-se ligado a uma bomba digital e capta 800 litros de ar por minuto. As partículas presentes no ar são depositadas em dois filtros de tamanhos diferentes (XL e M) (Figura 5 e 6, respectivamente): XL,  $P > 10 \mu\text{m}$  e M,  $2,5 < P < 10 \mu\text{m}$  que se encontram no interior do aparelho e que foram substituídos após 24 horas de utilização. Os filtros foram então conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até ao momento da extracção das amostras (Buters *et al.*, 2010)



Figura 4 Colector de partículas, Chemvol Sampler localizado na plataforma meteorológica situada na Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Évora, a 17m do solo



Figura 5: Filtro XL colocado numa das campânulas que constitui o colector



Figura 6: Filtro M colocado numa das campânulas que constitui o colector

Seguiu-se um processo de extracção, que permitiu recolher a parte proteica dos filtros, posteriormente os extractos são liofilizados e conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

### 2.3. Preparação dos filtros para recolha das amostras de aeroalergenos

A recolha das amostras foi precedida pela lavagem dos filtros. Este passo é efectuado para evitar que compostos químicos, que fazem parte da constituição dos filtros interfiram no ELISA dando falsos positivos.

#### Preparação do Tampão de Lavagem ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )

Para 1 Litro:

8g  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  + 1L  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada + 700  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_4$  (14%)

Ajustar o pH entre 8,11 e 8,15

Os filtros foram colocados em tinas e submersos com tampão de lavagem, colocou-se a tina durante 1 hora sobre o agitador a 6 rpm. Os filtros foram retirados e passados três vezes por água bidestilada; a última vez, foram deixados durante 1 hora sobre o agitador a 6 rpm. Foi retirada a maior parte da água dos filtros, e foram colocados na estufa a 37°C durante 4 dias sendo posteriormente guardados em sacos e protegidos da luz.

### 2.4. Procedimento para a extracção dos filtros

O processo de extracção foi modificado com vista a poder ser optimizado e melhorado. Para isso, procedeu-se à extracção de amostras com tampão bicarbonato suplementado com 0,05% de Triton. Deste modo a testou-se a eficácia da extracção, quando o Triton está presente nas amostras, permitindo que nestas, a proteína pudesse ser quantificada pelo método de Bradford.

Com o objectivo de minimizar o tempo dispendido pelo processo de liofilização, extraíram-se amostras com tampão fosfato suplementado com 0,1% de BSA, e suplementado com 0,05% de Triton.

Para o processo de extracção, partiu-se do tampão de lavagem dos filtros, ao qual se adicionou 0,1% de BSA. Após recolha diária os filtros, estes foram cortados em três partes. Cada parte foi colocada num tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL para filtros XL e de 15 mL para filtros M. Foram adicionados 15 mL de tampão de extracção no tubo do filtro XL, e 6 mL para extracção do filtro M. Os tubos foram colocados num agitador, onde foram

agitados por inversão (rotating - head over -head) durante 4 horas a 60 rpm, em ambiente escuro ou protegido da luz.

Seguiram-se dois passos de centrifugação, o primeiro a 1000g durante 5 minutos, e o segundo a 1500g 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e prepararam-se alíquotas de 2,5 mL para ambos os filtros. Foi-lhes adicionado 2 µL de BSA 10%, excepto em duas das alíquotas de 2 mL do filtro XL que foram designadas de “backup’s”. As amostras foram armazenadas a -80°C, e posteriormente liofilizadas durante 48 horas.

## 2.5. Quantificação do alergeno *Phl p 5*

A quantificação de alergenos foi realizada por métodos imunoquímicos (ELISA). O Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) é actualmente o método imunoquímico mais promissor para a quantificação de alergenos e consequentemente o adoptado neste trabalho para a determinação do *Phl p 5*. A popularidade do método ELISA “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”, tem que ver com a conveniência excepcional da placa multipoços. O antigénio ou anticorpo é revestido em cada poço da placa, e isso irá corresponder à ligação anticorpo ou antigénio na amostra teste. O complexo antigénio-anticorpo é quantificado pela adição de um enzima ligado a um anticorpo específico. No fim do ensaio, é possível observar os resultados, sendo a quantificação feita por espectrofotometria, através de leitores automáticos ou semi-automáticos (Chard, 1990).

Neste caso, recorreu-se a um método “Sandwich” assimétrico que se baseia na captura do alergeno *Phl p 5* com anticorpos monoclonais (mAb) (1D11), seguido da detecção com um anticorpo secundário monoclonal marcado com biotina (Bo1). A este complexo, adiciona-se um conjugado (estreptavidina-peroxidase) o qual, na sequência de adição de substrato, originará um produto corado quantificável por espectrofotometria de absorção molecular.

### Procedimento para a Quantificação do alergeno *Phl p 5* pelo método ELISA

A quantificação do alergeno *Phl p 5* foi efectuada por um método ELISA “sandwich”. Este método organiza-se em várias etapas, que estão resumidas na figura 7.

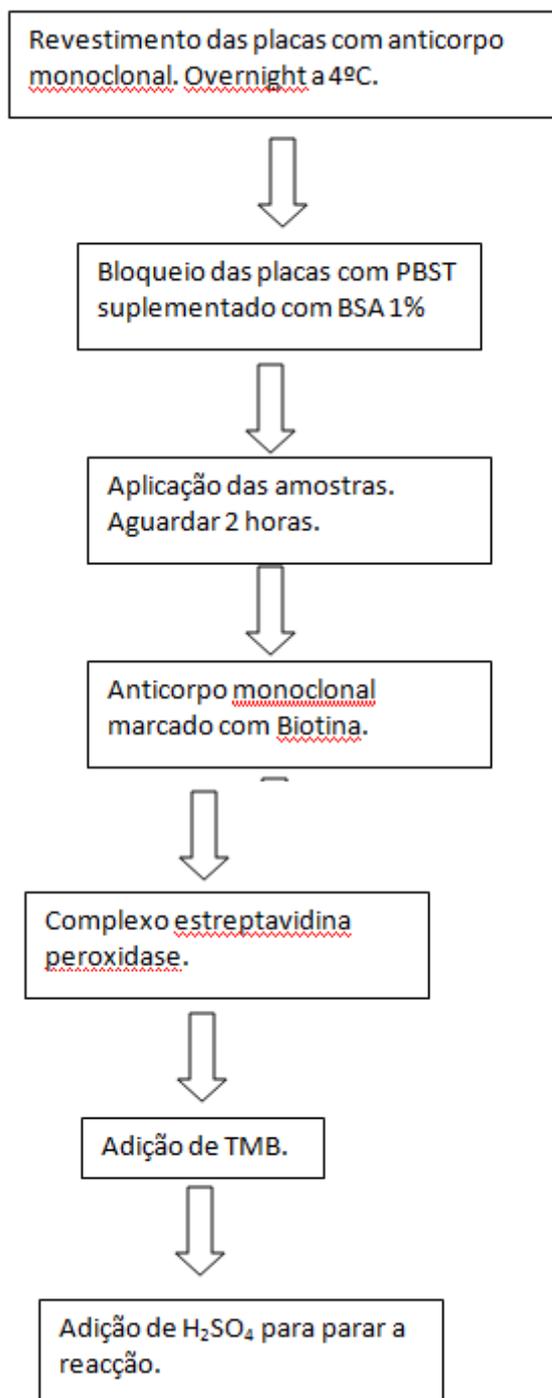


Figura 7: Esquema ilustrativo do método ELISA utilizado para quantificação do alergeno

Em todos os ensaios foi feita uma curva de calibração utilizando solução padrão de *Phl* p 5 de concentrações que variam no intervalo de 800 ng/mL a 1,5625 ng/mL foram preparadas por diluições sucessivas da solução padrão mais concentrada.

#### **Tampão de revestimento**

Para 1 L de tampão:

$$m(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 1,59 \text{ g}$$

$$m(\text{NaHCO}_3) = 2,93 \text{ g}$$

A solução é preparada com água miliQ, e o pH deve estar compreendido entre 9 e 10.

#### **PBS (20x)**

Para 1 L de tampão:

$$m(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 4 \text{ g}$$

$$m(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}) = 58 \text{ g}$$

$$m(\text{KCl}) = 4 \text{ g}$$

$$m(\text{NaCl}) = 160 \text{ g}$$

A solução é preparada com água bidestilada, e o pH deve estar entre 7,2 e 7,4.

#### **Tampão de lavagem (PBST)**

Para 1 L de tampão:

50 mL de PBS (20X)

0,5 g de Tween

Prefazer com água bidestilada.

**Tampão de bloqueio (1%)**

Volume final = 25 mL

25 mL de tampão de lavagem

0,25 g de BSA

**Tampão de diluição (0,1%)**

Volume final = 50 mL

50 mL de tampão de lavagem

0,05 g de BSA

**Solução Stop (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1,5 M**

Volume final = 500 mL

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M = 41,7 mL

Completar o volume com água bidestilada.

O revestimento da placa foi efectuado no dia anterior à realização do ensaio. O anticorpo primário foi hidratado com 1 mL de tampão de revestimento durante 10 minutos, ao qual se adicionou 9 mL de tampão. Foi feita a aplicação na placa, que fica a incubar *overnight*, a 4°C.

No dia do ensaio, iniciou-se pela lavagem da placa (3 vezes) com tampão de lavagem (PBST), prosseguiu-se o bloqueio e aguarda-se 30 minutos. As amostras foram rehidratadas com tampão de diluição, as diluições das amostras foram preparadas tendo em conta a informação do número de grãos de pólen obtido nas contagens pelo método Hirst. Secou-se bem a placa, sem a lavar e as amostras foram pipetadas e aguardaram-se duas horas. A placa foi lavada mais 3 vezes com PBST e pipetou-se o anticorpo de detecção (marcado com biotina), o qual actuou 1 hora. Lavou-se a placa 3 vezes e aplicou-se o enzima (estreptavidina peroxidase), e esperou-se 30 minutos. Por último lavou-se a placa 3 vezes e pipetou-se o TMB estava à temperatura ambiente, e aguardaram-se 10 minutos protegendo a placa da luz e sob agitação (80 rpm).

Parou-se a reacção com tampão stop H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e leu-se imediatamente no leitor de microplacas a 450 nm.

## 5. Resultados e Discussão

O *Phl* constitui uma das famílias de proteínas mais alérgica do pólen das gramíneas. Destas o *Phl p 5* é o principal alergeno presente e o responsável pelas rinites e asma brônquicas que atingem adultos e crianças, pelo que no presente trabalho pretendeu-se quantificar o *Phl p 5* existente em amostras de ar exterior colhidas na cidade de Évora, durante a época polínica de 2009, a determinação da sua quantidade no ar atmosférico se reveste de particular relevância. Contudo, a colheita e quantificação de aeroalergenos apresenta algumas dificuldades não estando actualmente descritos métodos fiáveis e reproduzíveis para o efeito.

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver uma metodologia para a colheita e quantificação de *Phl p 5* em ar atmosférico colhido na cidade de Évora e que a seguir se descreve.

### 5.1 Estabelecimento de um método ELISA para *Phl p 5*

A padronização do método utilizado para a quantificação do alergeno *Phl p 5* em amostras de ar atmosférico exterior constou uma etapa fundamental no presente trabalho, onde se avaliou a reprodutibilidade dos ensaios ELISA e o rigor dos resultados obtidos.

Para cada ensaio foi preparada uma curva de calibração utilizando soluções padrão de *Phl p 5* (conforme descrito nos métodos). A figura 7 mostra um exemplo de curva de calibração típica utilizada posteriormente para a determinação da concentração das amostras.

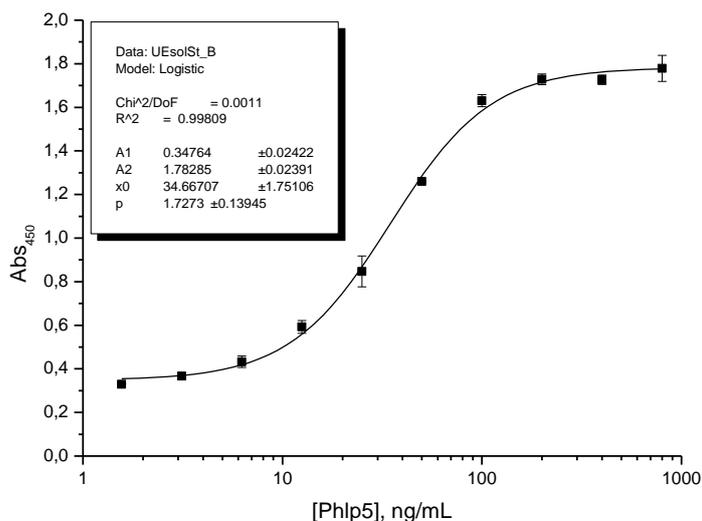


Figura 8: Curva de calibração para Phl p 5 representativa de 14 ensaios realizados

A reprodutibilidade do método foi ainda avaliada utilizando controlos positivos com concentração diferente (controlo 1 e controlo 2) e que se situam no intervalo de sensibilidade da curva de calibração. A figura 8 mostra os resultados obtidos para os controlos em todos os ensaios realizados correspondentes à análise da estação polínica de 2009. Pode observar-se que com os resultados foram reprodutíveis ao longo do tempo tendo-se registado valores para os controlos 1 e 2 cuja variabilidade se situou no intervalo médio  $\pm 20\%$  (fig.8, ver caixas sobre os pontos), que correspondeu  $25,1 \pm 4,9$  e  $7,7 \pm 1,4$  ng/mL, para o controlo 1 e 2, respectivamente.

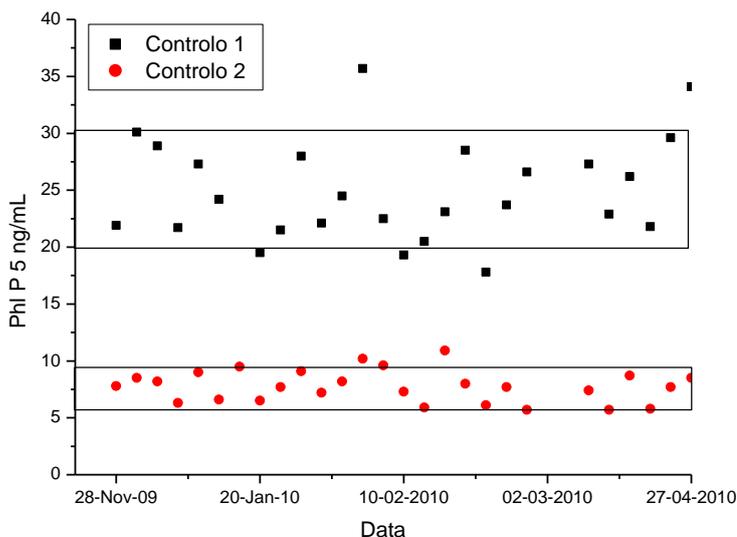


Figura 9: Variação da concentração dos controlos positivos nos ensaios realizados

Foi também avaliada a variabilidade do ensaio eventualmente introduzida pelos operadores. O quadro 3 resume os resultados obtidos para os três operadores que realizaram os ensaios.

Quadro 3: Variação da concentração dos controlos positivos nos ensaios realizados.

	Operador 1		Operador 2		Operador 3	
	Controlo A	Controlo B	Controlo A	Controlo B	Controlo A	Controlo B
<u>Média</u>	26,09	7,88	25,08	7,66	25,66	7,69
<u>s.d.</u>	4,81	1,42	4,05	1,24	4,46	0,99
<u>C.V.%</u>	18,43	18,01	16,16	16,22	17,38	12,85

Quando comparados entre si, pode observar-se que os diferentes operadores obtiveram uma variabilidade inferior a 20% nos ensaios realizados. Para além disso pode ainda observar-se que os valores médios obtidos para os controlos foram semelhantes independentemente do operador, quer para o controlo A quer para o controlo B ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, os valores médios obtidos pelos diferentes operadores foram também similares aos valores médios obtidos, no laboratório ( $25,1 \pm 4,9$  e  $7,7 \pm 1,4$  ng/mL, para o controlo 1 e 2, respectivamente) tendo a variabilidade registada entre operadores sido  $< 5\%$ .

Foi ainda avaliada a exactidão do ensaio utilizando uma amostra padronizada de concentração conhecida (450 ng/mL). A figura 10 mostra a concentração determinada para a amostra teste em diferentes ensaios realizados. Os valores obtidos situaram-se, com excepção de 3 pontos, no intervalo de variação considerado aceitável, ou seja, inferior a 20%. O valor médio considerando todos os ensaios foi de  $457,2 \pm 55,7$  e o coeficiente de variação foi de 12,2%.

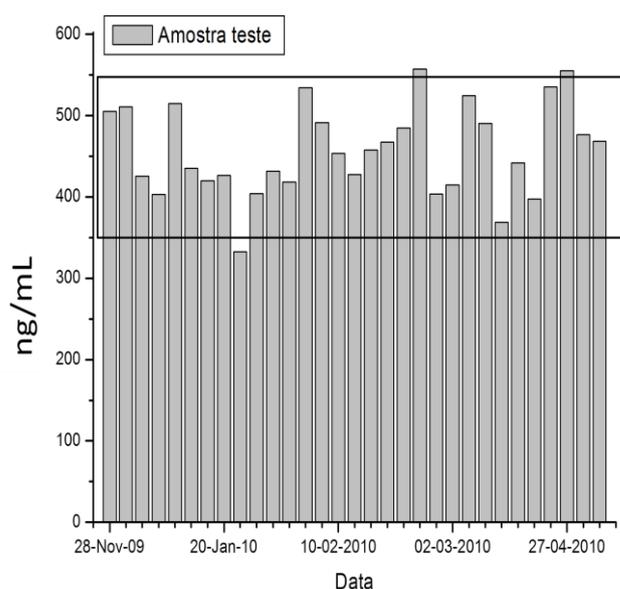


Figura 10: Variação da concentração da amostra teste para os diferentes ensaios

Dado que as amostras de trabalho são complexas, podendo conter elementos interferentes no ensaio, foi utilizada uma amostra teste que foi tratada do mesmo modo que o padrão, ou seja, foi sucessivamente diluída a partir de uma solução mãe e as curvas de diluição do padrão e da amostra foram comparadas. A figura 11 mostra que as curvas de diluição foram paralelas, em particular na zona de sensibilidade, atestando a aplicação do método.

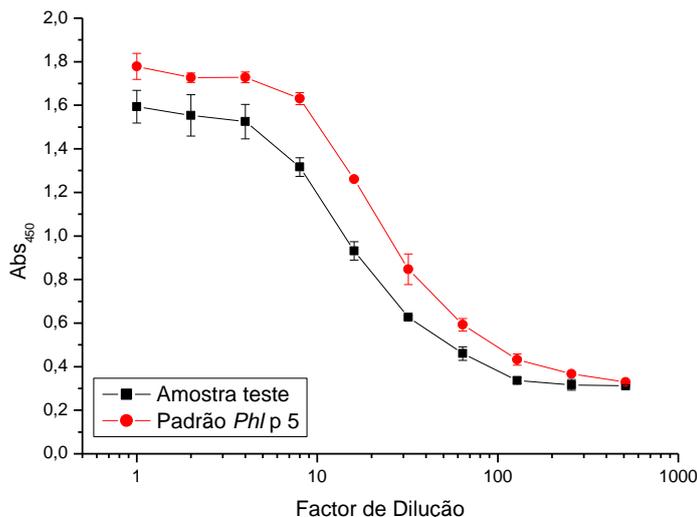


Figura 11: Curva de diluição da amostra teste para *Phl p5* representativa dos 14 ensaios realizados

Estes resultados em conjunto permitem concluir que o ensaio ELISA desenvolvido é fiável, reproduzível e que apresenta uma exactidão e uma precisão consideradas adequadas para estes métodos, sendo portanto adequado para a quantificação de *Phl p5* natural, extraído de amostras de ar exterior.

## 5.2 Alteração das condições de extracção

Constituiu um objectivo deste trabalho o estudo das condições de extracção das amostras. Para tal procedeu-se à extracção das amostras com diferentes volumes de tampão, nomeadamente tampão bicarbonato, suplementado de 0,05% de Triton X100 ou 0,1% de BSA, seguindo-se um processo de liofilização. Paralelamente, as amostras foram também extraídas com tampão fosfato, igualmente suplementado com 0,05% de Triton ou 0,1% de BSA. Neste último caso e como os fosfatos não interferem com o ELISA, as amostras não foram liofilizadas.

Na figura 12 encontram-se representados os resultados obtidos das amostras que foram extraídas com tampão bicarbonato suplementado de BSA ou Triton. Constatou-se que a extracção com tampão bicarbonato suplementado com

0,1% de BSA se mostrou mais eficaz (os valores para a quantidade de alergénio, obtidos em  $\text{pg}/\text{m}^3$  em 24 horas, foram na generalidade muito superiores) do que os da extracção em que este mesmo tampão foi suplementado com Triton 0,05%.

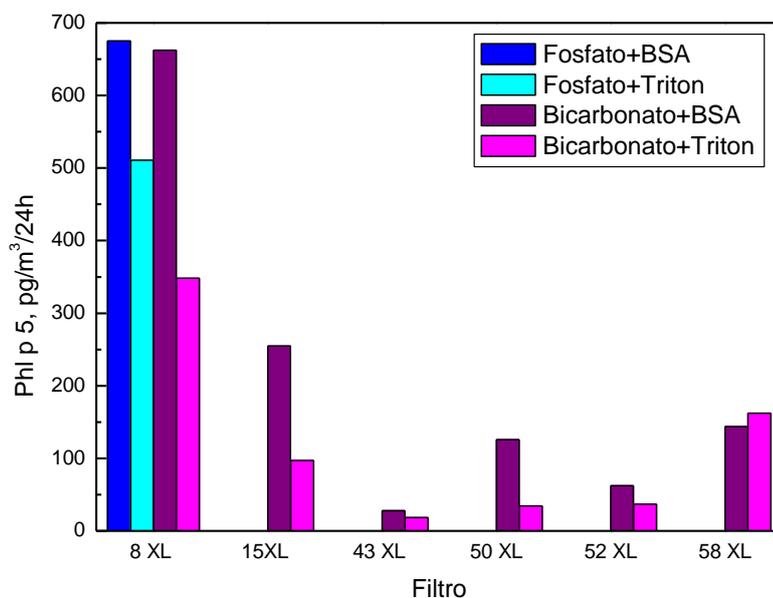


Figura 12: Extracção de amostras com tampão bicarbonato suplementado com BSA ou com Triton e Extracção de amostras com tampão fosfato suplementado com BSA ou Triton

Relativamente à figura 12, encontram-se representadas as amostras que foram extraídas com tampão fosfato suplementado de BSA ou Triton. Neste gráfico apenas estão apresentados valores para a amostra referente ao filtro 8 XL, muito provavelmente porque, aquando da utilização de tampão fosfato não se pode seguir o processo de liofilização (processo este que concentra as amostras cerca de dez vezes). Desta forma, as restantes amostras terão ficado demasiado diluídas e não foi possível a sua quantificação por ELISA.

### 5.3 Conteúdo em alergeno *Phl p 5* contido nos filtros

Não é ainda claro hoje em dia, se os aeroalergenos se encontram apenas associados aos grãos de pólen. De facto, há divergências na literatura, onde se sugere que estes podem encontrar-se associados a partículas submicrónicas e

ainda que ocorrem desvios do conteúdo em alergenos do a e as contagens polínicas.

Assim, dado que se utilizou um equipamento que permite fraccionar os bioaerossóis de acordo com as suas dimensões, procurou-se avaliar o conteúdo em aeroalergeno nessas fracções.

A figura 13 mostra os resultados obtidos, onde se evidencia a quantidade de aeroalergeno retido nos filtros XL e M que retêm respectivamente partículas com dimensões superiores a  $10\mu\text{m}$  e entre  $2,5$  e  $10\mu\text{m}$ .

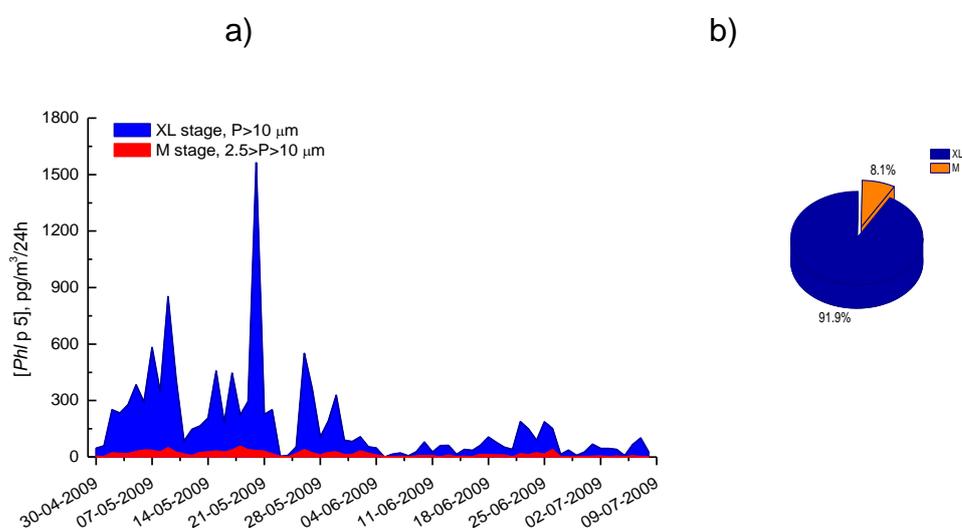


Figura 13: a) Quantificação do alergeno *Phl p 5* contido nos filtros XL e M. O conteúdo em alergeno retido nos filtros XL e M baseia-se na dimensão das partículas presentes no ar b) Relação entre a percentagem de alergeno retido no filtro XL e no filtro M

Como é possível constatar pela figura 13.b), no filtro XL fica retido cerca de 90% do alergeno, enquanto que no filtro M apenas ficou retido menos que 10% do alergeno. Apesar das diferenças na quantidade em aeroalergeno contido nas duas fracções, os perfis de distribuição são semelhantes, tendo-se observado que estes são proporcionais ao longo da estação. Dado que as partículas presentes no ar são depositadas em cada um dos filtros com base na sua dimensão, os resultados sugerem que a maior parte do alergeno terá dimensão superior a  $10\mu\text{m}$ , e estará por isso associado maioritariamente ao grão de pólen.

#### 5.4. Estudo de correlação entre o conteúdo em aeroalergeno e pólen

Na secção anterior observou-se que o perfil da curva em aeroalergeno apresentou vários picos em 2009.

O gráfico 1 mostrou que o perfil da curva de *Phl p 5* apresentou três picos principais compreendidos entre 30 de Abril e 04 de Junho tendo-se observado valores máximos nos dias 22 e 23 de Maio.

Nesta figura pode ainda constatar-se que a curva de aeroalergeno acompanhou a curva polínica, seguindo uma correlação positiva entre os dois parâmetros (figura 13).

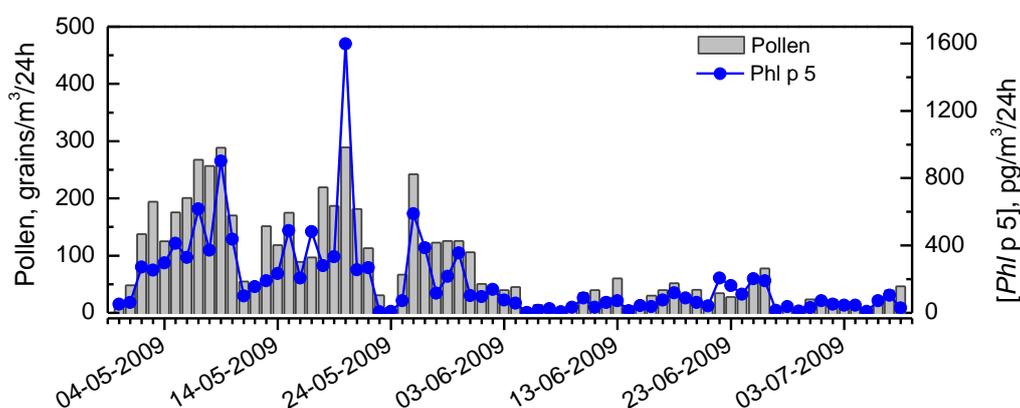


Figura 14: Expressão polínica de pólen *Phleum pratense* vs quantidade de alergeno *Phl p 5* presente nos filtros XL e M. Os valores apresentados representam o nº de grãos de pólen obtidos durante a época polínica através do método Hirst, e quantidade de alergeno que foi determinada nos filtros XL e M utilizando o método ELISA

De facto, ao delinear uma correlação entre as contagens polínicas e os conteúdos em aeroalergeno, observou-se uma correlação positiva entre estes parâmetros com coeficiente de correlação de 0,6759 (figura 15).

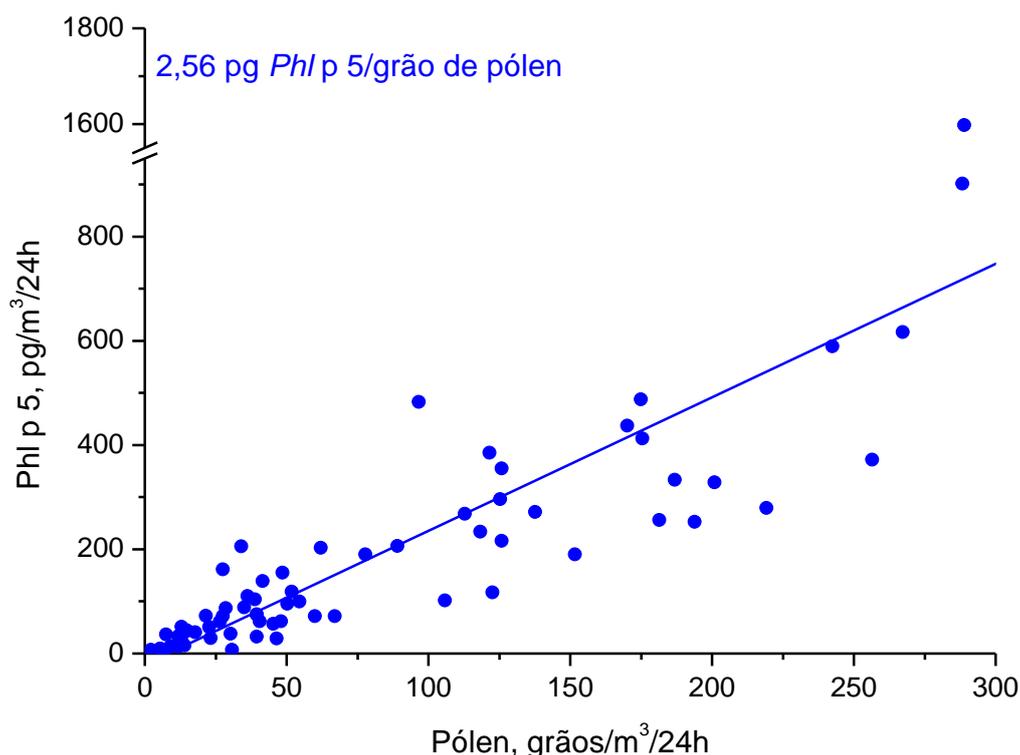


Figura 15: Correlação: Contagem polínica vs [Phl p5] pg/m<sup>3</sup> Filtro XL + Filtro M. O número de grãos de pólen obtidos pela contagem através do método Hirst relaciona-se com a quantidade de alérgeno obtido por ELISA

Tendo em conta esta correlação, pode-se inferir que a quantidade de *Phl p 5* por grão de pólen foi de 2,56 pg no ano 2009. Este valor é muito semelhante ao obtido calculando a razão entre o valor total de alérgeno e o total de pólen durante a estação polínica (2,30 pg/grão de pólen).

Em suma, estes resultados, em conjunto, permitiram inferir que o aeroalérgeno *Phl p 5* se encontra maioritariamente nos grãos de pólen, sendo que apenas 10% se associam a partículas submicrómicas.

Contudo, e à semelhança do que já foi observado no caso da *Bet v1*, existem pontos onde se observou um desvio entre o conteúdo em pólen e em aeroalérgenos (figura 15).

## 6. Conclusões

Neste trabalho procurou-se estabelecer uma metodologia fiável para a extracção e quantificação de *Phl p 5* captado do ar exterior. Adicionalmente procurou-se também estudar a correlação entre os conteúdos de *Phl p 5* e de pólen de gramíneas no ar exterior na cidade de Évora.

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- O método ELISA revelou ser bastante sensível, permitindo quantificar o aeroalergeno *Phl p 5*;
- O ensaio é reprodutível sendo a variação inter-ensaio inferior a 20%, para quantificação do aeroalergeno *Phl p 5* em amostras de ar atmosférico exterior colhidas em Évora no ano 2009;
- A solução tampão mais adequada para extrair os aeroalergenos dos filtros e permitir a sua quantificação foi o tampão bicarbonato contendo BSA;
- Observou-se uma distribuição proporcional do aeroalergeno nos filtros XL e M, embora cerca de 90% do aeroalergeno se tenha encontrado no filtro XL, que retém partículas  $>10\mu\text{m}$ ;
- Os perfis das curvas polínicas de gramíneas e de *Phl p 5* foram semelhantes, embora se registassem algumas discrepâncias;
- Observou-se uma correlação positiva entre as contagens polínicas e a conteúdo em *Phl p 5* diários;
- O valor de *Phl p 5*/grão de pólen foi cerca de 2,56pg em 2009;

Em suma, no seu conjunto os resultados mostram que foi possível estabelecer um método fiável para a quantificação de *Phl p 5*. Sugerem ainda que este aeroalergeno se encontra maioritariamente associado ao grão de pólen. Apenas uma parte pode, ser encontrado em partículas submicrónicas. Pontualmente, as contagens polínicas não foram representativas do conteúdo em *Phl p 5* do ar.

Assim, a determinação dos aeroalergenos podem vir a complementar a informação polínica, permitindo uma melhor previsão do risco de exposição a aeroalergenos.

## 7. Bibliografia

- ✚ Akirav, *et al.* (2008) “Fundamental Immunology” 6<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins. U.K.
- ✚ Arias, *et. al.* (2002) “Polinosis – Polen y alergia”, *mra ediciones*
- ✚ Becker, W. M., Bufe, A., Petersen, Schlaak, A. M. (1995) “ Molecular Characterization of Timothy grass pollen group V allergens” *Int Arch Allergy Immunol*, 107 (1-3): 242-4.
- ✚ Brito, *et al.* (2010) “Grass Pollen, Aeroallergens, and Clinical Symptoms in Ciudad Real, Spain” *J Investig Allergol Clin Immunol* 20(4), 295-302.
- ✚ Bufe, A., Schramm, G., Keown, M.B., Schlaak, M., Becker, W.-M. (1995) “ Major allergen *Phl p Vb* in the timothy grass is a novel pollen RNase” *FEBS Letters* 363:6-12.
- ✚ Burmester, G-R., Pezzutto, A. (2003) “ Color Atlas of Immunology”, *Thieme*
- ✚ Buters, *et al.* (2010) “The allergen Bet v 1 infractions of ambient air deviates from birch pollen counts” *Allergy DOI* 10.1111, 1398-1407.
- ✚ Camacho, I. (2007) “Estudo aerobiológico da cidade do Funchal. Detecção bioquímica dos principais aeroalergénios polínicos”, *Universidade da Madeira*.
- ✚ Carvalho, *et al.* (2008) “Performance of the Coriolis air Sampler, a high-volume aerosol-collection system for quantification of airborne spores and pollen grains” *Aerobiologia* 24, 191-201.
- ✚ Chard, T. (1990) “Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology” 4<sup>th</sup> revised edition: *Elsevier*.

- ✚ Flicker, et al. (2000) “A Human Monoclonal IgE Antibody Defines a Highly Allergenic Fragment of the Major Timothy Grass Pollen Allergen, *Phl p5*: Molecular, Immunological, and Structural Characterization Characterization of the Epitope Containing Domain” *J. Immunol* 165:3849-59.
  
- ✚ García-Mozo, et al. (2009) “Predicting the start and peak dates of the Poaceae pollen season in Spain using process-based models” *Agricultural and Forest Meteorology* 149:256-62.
  
- ✚ Gómez-Domenech, et al. (2010) “Evaluation of the efficiency of the Coriolis air sampler for pollen detection in South Europe” *Aerobiologia* 26, 149-55.
  
- ✚ Hantusch, et al. (2004) “Affinity determinations of purified IgE and IgG antibodies against the major pollen allergens *Phl p5a* and Bet V1a: Discrepancy between IgE and IgG binding Strength” *Immunology Letters* 97:81-9.
  
- ✚ Kemeny, D.M. (1991) “A practical guide to ELISA” 1<sup>st</sup>ED. Pergamon Press. U.K.
  
- ✚ Levetin, E. (2004) “methods for Aeroallergen sampling” *Current Allergy and Asthma Reports* 4, 376-83.
  
- ✚ Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B., Roitt, I. (2006) “ Immunology 7<sup>th</sup> ED.” *Mosby Elsevier*
  
- ✚ O’ Gorman, M.R.G., Donnenberg, A.D. (2008) “Handbook of Human Immunology” 2<sup>nd</sup>Edition. CRC Press. USA.
  
- ✚ Puc, M. (2003) “Characterization of pollen allergens” *Ann Agric Environ Med* 10, 143-49.

- ✚ Reid, C.E., Gamble, J.L. (2009) “Aeroallergens, Allergic Disease, and Climate Change: impacts and adaptation” *EcoHealth* 6, 458-70.
- ✚ Renault- Miskovsky, J., Petzold, M. (1990) “ Spores et Pollen”, *Editions La Duraulie*
- ✚ Ribeiro, H., Oliveira, M., Ribeiro, N., Cruz, A., Ferreira, A., Machado, H., Reis, A., Abreu, I. (2009) “Pollen allergenic potencial nature of some trees species: A multidisciplinary approach using aerobiological immunochemical and hospital admissions data” *Environmental Research* 109:328-33.
- ✚ Rodríguez-Rajo, F.J., Astray, G, Ferreiro-Lage, J.A., Aira, M.J., Jato-Rodriguez, M.V., Mejuto, J.C. (2010); Evaluation of atmospheric Poaceae pollen concentration using a neural network applied to a costal Atlantic Climate region; *Neural Networks*; 23, 419-25.
- ✚ Sázelová, P., Kasicka, V., Koval, D., Petre, G. (2004) “Analysis of liquid extracts from tree and grass pollens by capillary electromigration methods” *Journal of Chromotography B*, 808:117-23.
- ✚ Steinberger, P., Kraft, D., Valenta, R. (1996) “Construction of a Combinatorial IgE Library from an Allergic Patient” *The Journal of Biological Chemistry* 271(18):10967-72.
- ✚ Valenta, R., Kraft, D. (2002) “From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy” *Current Opinion in Immunology* 14:718-27.
- ✚ Wilson, K., Walker, J. (2000) “ Principles and Techniques of Practical Biochemistry” 5<sup>th</sup> Edition, *Cambridge University Press*

- ✚ Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V., Lichtig, J. (1998) “ Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes” *Química Nova* 21 (6): 787-93.