



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Imunorreatividade a alergénios de pólenes de plátano e azinheira numa população de Évora com doença alérgica respiratória sazonal**

**Rute Isabel Martins Arriegas**

Orientação: Professora Doutora Célia Antunes

Professora Doutora Ana Costa

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2016





**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Imunorreatividade a alergénios de pólenes de plátano e azinheira numa população de Évora com doença alérgica respiratória sazonal**

**Rute Isabel Martins Arriegas**

Orientação: Professora Doutora Célia Antunes

Professora Doutora Ana Costa

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2016



## APOIOS





## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar quero agradecer às entidades financiadoras deste projeto, à Escola de Ciências e Tecnologia, ao Instituto de Ciências da Terra, ao Instituto de Investigação e Formação Avançada da Universidade de Évora, à Fundação para a Ciência e Tecnologia, ao COMPETE 2020 e ao Portugal 2020. Queria também agradecer a todas as farmácias que demonstraram interesse e disponibilidade para me fornecer os dados relativamente à venda de medicamentos, nomeadamente à Doutora Maria Inês Mata da Farmácia da Misericórdia, à Farmácia Diana, à Doutora Dina Pereira da Farmácia Gusmão, à Doutora Maria Lobo da Farmácia Galeno e ao Doutor Fernando Miranda da Farmácia Motta. Queria agradecer especialmente ao Doutor Joaquim Condeço da Silva por toda a ajuda e por me ter posto em contacto com o Centro de Estudos e Avaliação em Saúde, entidade que me forneceu os dados que eu precisava e à qual eu gostaria também de agradecer.

À Universidade de Évora, estabelecimento de ensino onde concluí a minha licenciatura e que me deu a oportunidade de adquirir todo o conhecimento e experiência e onde fiz amigos que vou levar para a vida.

À professora Doutora Célia Antunes por ser minha orientadora, por toda a disponibilidade, paciência e conhecimentos transmitidos.

À professora Doutora Ana Costa, por todo o conhecimento que me transmitiu, toda a disponibilidade que teve para me ensinar.

Quero também agradecer às minhas colegas de laboratório Inês Tarana e Isabel Calhau, por todo o apoio que me deram durante a concretização deste trabalho, pela amizade e pela ajuda, que fez com que tudo se tornasse mais fácil de concretizar.

Por fim, à minha família, em especial aos meus pais, à minha irmã e avós, por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço. Sei que sem eles teria sido tudo muito mais difícil e que não teria tido esta excelente oportunidade.



## INDICE

AGRADECIMENTOS	i
INDICE	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	ix
ABREVIATURAS	xi
UNIDADES	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
<i>Introdução</i>	1
1.1. Alergia	3
1.1.1. Imunidade: componentes celulares e moleculares	3
1.1.1.1. Células envolvidas na resposta imunitária	4
1.1.1.2. Imunoglobulinas	8
1.1.1.1. Interleucinas	9
1.1.2. Reações de hipersensibilidade do tipo I	11
1.1.2.1. Fase de sensibilização	11
1.1.2.2. Fase efetora	13
1.1.2.3. Natureza dos alergénios e reatividade cruzada	13
1.1.3. Terapêutica medicamentosa na alergia	14
1.1.4. Métodos usados no diagnóstico de alergias	15
1.1.4.1. Teste in vivo - <i>skin prick test</i> – SPT	15
1.1.4.2. <i>Radio-allergosorbent test</i> (RAST) e <i>Enzyme-Allergosorbent test</i> (EAST)	16
1.1.4.3. ImmunoCap	16
1.1.4.4. Testes de ativação de basófilos	17
1.2. Polinose (alergia ao pólen)	18
1.2.1. Tipos polínicos alergizantes em Portugal	19
1.2.1.1. Gramíneas – “ <i>Dactylis glomerata</i> ”	20
1.2.1.2. Plátano – “ <i>Platanus hybrida</i> ”	21
1.2.1.3. Azinheira – “ <i>Quercus rotundifolia</i> ”	22

1.2.2.	Pólen e os seus alergénios	23
1.2.2.1.	Alergénios encontrados nas gramíneas	24
1.2.2.2.	Alergénios encontrados em plátano	25
1.2.2.3.	Alergénios encontrados em <i>Quercus</i>	25
1.3.	Metodologias usadas na investigação de novos alergénios	26
1.3.1.	Eletroforese	26
1.3.1.1.	SDS-PAGE	26
1.3.1.2.	Focagem isoeletrica - IEF	27
1.3.2.	Imunoblot	28
1.3.3.	Utilização de linhas celulares	28
	<i>Objetivos</i>	31
2.1.	Objetivo geral	33
2.2.	Objetivos específicos	33
	<i>Problema</i>	35
	<i>Materiais e métodos</i>	39
4.1.	Estratégia	41
4.2.	Procedimento experimental	41
4.2.1.	Indicadores indiretos de sintomas	41
4.2.2.	Dados de índice polínico	42
4.2.3.	Obtenção dos soros de indivíduos alérgicos	42
4.2.4.	Preparação dos extratos proteicos de <i>P.hybrida</i> , <i>Q.rotundifolia</i> e <i>D.glomerata</i>	42
4.2.2.1.	Quantificação de proteínas	43
4.2.3.	<i>Enzyme Allergo Sorbent Test</i> -EAST	44
4.2.4.	Separação de proteínas	45
4.2.4.1.	Focagem isoeletrica (IEF)	45
4.2.4.2.	Eletroforese SDS-PAGE	47
4.2.5.	Transferência por capilaridade dos géis de IEF	48
4.2.6.	Eletrotransferência dos géis de SDS-PAGE	48
4.2.7.	Imunodeteção	49
4.3.	Ensaio biológico com a linha celular RBL-H21 – Libertação de $\beta$ – Hexosaminidase	50
4.4.	Análise estatística	51
	<i>Resultados e discussão</i>	53

5.1. Caracterização da venda de fármacos anti-alérgicos	55
5.1.1. Estudo de indicadores de sintomas da população alérgica do Alentejo	55
5.1.2. Caracterização da sensibilização dos indivíduos alérgicos obtida por testes de PRICK	60
5.1.3. Estudo de imunorreatividade a <i>P.hybrida</i> e <i>Q.rotundifolia</i>	61
5.1.4. Estudo do efeito dos extratos de <i>Q.rotundifolia</i> e <i>P.hybrida</i> na desgranulação de basófilos	63
5.2. Identificação de bandas imunorreativas nos extratos polínicos de <i>P.hybrida</i> e <i>Q.rotundifolia</i>	66
5.2.1. Identificação de bandas imunorreativas em função do pI	66
5.2. Identificação de bandas imunorreativas com base na sua massa molecular	69
<i>Conclusão</i>	73
<i>Referências Bibliográficas</i>	77
<i>Anexos</i>	A - 1
Lista de Reagentes	A - 3
Lista de Materiais	A - 4
Lista de equipamentos	A - 5
Preparação dos padrões de BSA	A - 6
Preparação de Soluções	A - 6
<i>Quantificação de proteína</i>	A - 6
<i>Focagem Isoelétrica em gel de policrilamida</i>	A - 7
<i>SDS-PAGE</i>	A - 8
<i>Imunobloting</i>	A - 10
<i>Ensaaios com células RBL</i>	A - 11

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Células envolvidas na imunidade inata e adaptativa (adaptado de <a href="http://missinglink.ucsf.edu">missinglink.ucsf.edu</a> <sup>[1]</sup> ). .....	3
Figura 2 - Representação de uma imunoglobulina (adaptado de <a href="http://static.abdserotec.com">static.abdserotec.com</a> <sup>[2]</sup> ). .....	8
Figura 3 - Mecanismo geral das reações de hipersensibilidade do tipo I (adaptado de kindt et al., 2007). .....	11
Figura 4 – Exemplo de um mecanismo de reatividade cruzada (retirado de Bohle, 2014). .....	14
Figura 5- Exemplo de um teste PRICK (retirado de <a href="http://allergyclinic.co.uk">allergyclinic.co.uk</a> <sup>[3]</sup> ). .....	15
Figura 6– Esquema ilustrativo da técnica EAST (adaptado de Arosa et al., 2007). .....	16
Figura 7 – Ilustração do teste ImmunoCap - <i>Rapid</i> (adaptado de <a href="http://phadia.com">phadia.com</a> <sup>[4]</sup> ). .....	17
Figura 8 - Esquema ilustrativo do teste de ativação de basófilos (Adaptado de <a href="http://raphaels7.wordpress.com">raphaels7.wordpress.com</a> <sup>[5]</sup> ). .....	18
Figura 9 - Valores percentuais de tipos polínicos na região de Évora (retirado de Caeiro, 2013). .....	19
Figura 10 - Taxa de arbóreos (A) e Taxa de herbáceos (B) de Évora entre o ano 2001 e 2008 (adaptado de Caeiro, 2013). .....	20
Figura 11 - Imagem representativa da flor de <i>D. glomerata</i> (retirado de <a href="http://flora-on">flora-on</a> <sup>[7]</sup> ). .....	20
Figura 12 - Distribuição geográfica de plátano em Portugal (A) (retirado de “jardim botânico utad   platanus hispânica,” <sup>[8]</sup> ); imagem de uma árvore de plátano (retirado de <a href="http://allergome.org">allergome.org</a> <sup>[9]</sup> ) .....	21
Figura 13 - Distribuição geográfica da azinheira em Portugal (A) (retirado de <a href="http://naturdata.com">naturdata.com</a> <sup>[14]</sup> ); Imagem representativa da árvore de azinheira (B) (retirado de <a href="http://flora-on.com">flora-on.com</a> <sup>[7]</sup> ); Imagem representativa da folha de azinheira (retirado de <a href="http://flora-on.com">flora-on.com</a> <sup>[7]</sup> ). .....	23
Figura 14 - Grão de pólen de <i>D.glomerata</i> (A), <i>Q.rotundifolia</i> (B); <i>P.hyspanica</i> (C) (retirado de <a href="http://pharmallerga.com">pharmallerga.com</a> <sup>[15]</sup> e <a href="http://plantasyhongos.es">plantasyhongos.es</a> <sup>[16]</sup> ). .....	23
Figura 15 - Distribuição geográfica de <i>D. glomerata</i> em Portugal (retirado de “jardim botânico utad   dactylis glomerata” <sup>[8]</sup> ). .....	24
Figura 16 - Representação esquemática de eletroforese por SDS-PAGE (adaptado de <a href="http://protocolosonline.com">protocolosonline.com</a> <sup>[17]</sup> ). .....	27

Figura 17 - Representação de uma IEF (Amersham, 1998).....	27
Figura 18 - Esquema ilustrativo dos processo de imunodeteção (adaptado de genscript.com <sup>[18]</sup> ).....	28
Figura 19 - Esquema da reação que ocorre no método de Bradford (adaptado de qcbio.com <sup>[20]</sup> ). ....	43
Figura 20 - Curva de calibração obtida pelo método de Bradford. Os pontos apresentados são correspondentes a triplicados. ....	44
Figura 21 - Exemplo da microplaca utilizada para o imunoblot em substrato sólido. ....	45
Figura 22 - Equipamento utilizado para a corrida eletroforética IEF. ....	46
Figura 23 -Esquema de montagem de uma eletrotransferência de proteínas de um gel para uma membrana (adaptado de West, 2004). ....	49
Figura 24 - Representação esquemática do imunoensaio com cultura celular RBL (adaptado do protocolo fornecido por Zaum).....	51
Figura 25 - Média do número de embalagens vendidas durante cada mês entre os anos 2010 e 2015, para os grupos 1 e 2. G1+G2 diz respeito ao somatório do número de embalagens dos dois grupos.....	56
Figura 26 - Número de grãos de pólen registados ao longo dos diferentes meses do ano.....	57
Figura 27 - Correlação entre vendas de medicamentos e grãos de pólen/m <sup>3</sup> ; correlação das vendas do grupo 1 com o índice polínico mensal para cada espécie e o somatório(A); correlação das vendas do grupo 2 com o índice polínico mensal para cada espécie e o somatório (B); Correlação entre a venda de fármacos dos grupos 1 e 2 com o índice polínico mensal para cada espécie e o somatório (C). ....	58
Figura 28- Determinação da sensibilização a <i>P.hybrida</i> pelo método EAST. Os gráficos apresentados são correspondentes à média de triplicados $\pm$ DPM. ....	62
Figura 29 - Determinação da sensibilização a <i>Q.rotundifolia</i> pelo método EAST. Os gráficos apresentados são correspondentes à média de triplicados $\pm$ DPM. ....	62
Figura 30- Curva dose-resposta obtida após sensibilização das células com duas pools diferentes de soros de indivíduos sensibilizados e estimulação com o extrato de <i>P. hybrida</i> , com células sensibilizadas com pool PlaP1 e PlaP2. Os resultados apresentados resultam da média $\pm$ DPM, com n= 2 para cada experiência. ....	64
Figura 31 - Curva dose-resposta obtida após sensibilização das células com duas pools diferentes de soros de indivíduos sensibilizados e estimulação com o extrato de <i>Q. rotundifolia</i> ,	

com células sensibilizadas com pool QueP1 e QueP2. Os resultados apresentados resultam da média  $\pm$  DPM, com n= 2 para cada experiência..... 65

Figura 32 - Identificação de bandas imunorreativas dos diferentes soros para *P.hybrida* (NI-Não Inibido; I-Inibido)..... 66

Figura 33 - Identificação das bandas imunorreativas dos diferentes soros para *Q.rotundifolia* (NI-não inibido e I-Inibido)..... 67

Figura 34 - Identificação de bandas imunorreativas dos diferentes soros para *P. hybrida* após separação com base na Massa Molecular (NI-não inibido e I-Inibido). ..... 69

Figura 35- Identificação de bandas imunorreativas dos diferentes soros para *Q. rotundifolia* após separação com base na Massa Molecular (NI-não inibido e I-Inibido). ..... 70

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos biológicos dos produtos libertados pelos mastócitos (adaptado de Galli, 2014). .....	7
Tabela 2 - Características principais dos mastócitos e basófilos (adaptado de Hajime Karasuyma, 2014). .....	8
Tabela 3 –Propriedades das diferentes classes de imunoglobulinas (adaptado de Júnior et al., 2010). .....	9
Tabela 4 - Grupos funcionais de citocinas selecionadas (Kindt et al., 2007). .....	10
Tabela 5 – Características principais das células apresentadoras de antígeno (retirado de Arosa et al., 2007). .....	12
Tabela 6 - Características dos diferentes alérgenos de <i>D. glomerata</i> (retirado de allergome.org <sup>[9]</sup> ). .....	24
Tabela 7 - Características dos diferentes alérgenos de <i>P.hybrida</i> (retirado de allergome.org <sup>[9]</sup> ). .....	25
Tabela 8 - Características dos diferentes alérgenos das espécies do género <i>Quercus</i> (retirado de allergome.org <sup>[9]</sup> ). .....	26
Tabela 9 - Mistura necessária para obtenção do gel de IEF.....	46
Tabela 10 – Mistura necessária para obtenção do gel de resolução e de concentração da SDS-PAGE.....	47
Tabela 11- Medicamento prescritos para o tratamento da doença alérgica respiratória. Grupo 1 – medicamentos prescritos ao longo do ano; grupo 2 – medicamentos prescritos em caso de SOS.....	55
Tabela 12 - Valores médios mensais de grãos de pólen para plátano, <i>Quercus</i> , poáceas e oliveira e somatório dos grãos de pólen libertados por estas espécies. Os resultados foram retirados de Caeiro, 2013. ....	57
Tabela 13 - Testes de <i>Pearson</i> entre as vendas de medicamentos (grupos 1, 2 e somatório) e as espécies em estudo e o seu somatório.....	59
Tabela 14 - Quadro resumo com sensibilização dos indivíduos alérgicos (positivo: +; negativo: - ; sem observação: s/o). .....	60
Tabela 15 - Quadro resumo da sensibilização dos diferentes pacientes ás espécies da família Poaceae (positivo: +; negativo: - ; sem observação: s/o). .....	61
Tabela 16 - Constituição das diferentes pools de soros. ....	63

Tabela 17 - Identificação de bandas imunorreativas com base no ponto isoeletrico para a espécie *P.hybrida* Imunorreatividade (+); Inibição(-)..... 67

Tabela 18 - Identificação de bandas imunorreativas com base no ponto isoeletrico para a espécie *Q.rotundifolia* Imunorreatividade (+); Inibição (-)..... 68

Tabela 19 - Identificação de bandas imunorreativas com base na Massa Molecular para a espécie *P. hybrida*: Imunorreatividade (+); Inibição (-)..... 69

Tabela 20- Identificação de bandas imunorreativas com base na Massa Molecular para a espécie *Q. rotundifolia*: Imunorreatividade (+); Inibição (-). ..... 70

## ABREVIATURAS

- **APS:** Persulfato de amónio (do inglês *Ammonium Persulfate*)
- **BSA:** Albumina de soro de bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)
- **DTT:** Ditiotreitól (do inglês *Dithiothreitol*)
- **Fc:** Região efetora da Imunoglobulina
- **FcεRI:** Recetor de alta afinidade para a IgE
- **FBS:** Soro de Bovino Fetal (do inglês *Fetal Bovine Serum*)
- **FMN:** Mononucleótido de flavina ou 5'- fosfato de riboflavina (do inglês *Flavin Mononucleotide or riboflavin-5'-phosphate*)
- **IEF:** Isoeletrofocagem (do inglês *Isoelectric Focusing*)
- **IFN-γ:** Interferão gama (do inglês *Interferon gamma*)
- **IgA:** Imunoglobulina A (do inglês *Immunoglobulin A*)
- **IgD:** Imunoglobulina D (do inglês *Immunoglobulin D*)
- **IgE:** imunoglobulina E (do inglês *Immunoglobulin E*)
- **IgG:** Imunoglobulina G (do inglês *Immunoglobulin G*)
- **IgM:** Imunoglobulina M (do inglês *Immunoglobulin M*)
- **IL:** Interleucina (do inglês *Interleukin*)
- **MM:** Massa Molecular
- **pI:** Ponto Isoelétrico
- **PVDF:** Fluoreto de polivinilideno (do inglês *Polyvinylidene Difluoride*)
- **RAST:** *Radioallergosorbent Test*
- **SDS:** Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*)
- **TEMED:** N,N,N',N' – tetrametiletileno-diamina ´
- **TBS -T:** Tampão Salino Tris com detergente (do inglês *Tris Buffered Saline Tween*)
- **TBS:** Tampão Salino Tris (*Tris Buffered Saline*)
- **Tris:** Tris(hidroximetil)aminometano

## UNIDADES

- **(w/v)**: peso/volume
- **(m/v)**: massa/volume
- **(v/v)**: volume/volume
- **g**: Grama
- **g**: Força gravitacional
- **h**: Hora
- **mA**: Miliampere
- **V**: Volt
- **C**: Graus Celsius
- **%**: Percentagem
- **cm**: centímetro
- **kDa**: KiloDalton
- **L**: Litro
- **min**: Minuto
- **W**: Watt
- **M**: molar

## RESUMO

### **Imunorreatividade a alergénios de pólenes de plátano e azinheira numa população de Évora com doença alérgica respiratória sazonal**

Este trabalho teve como objetivo a caracterização do perfil alergológico de pólenes de plátano (*P.hybrida*) e de azinheira (*Q.rotundifolia*).

Recolheram-se dados de venda de fármacos anti-alérgicos e dos índices polínicos na região de Évora. Os alergénios destes tipos polínicos foram avaliados por técnicas de imunoblot, utilizando soros humanos, e a atividade alérgica dos extratos foi avaliada em ensaios celulares (RBL-h21).

Observou-se uma correlação positiva entre a venda de fármacos anti-alérgicos e os índices polínicos. Foi encontrada imunorreatividade positiva em todos os soros testados, a plátano e azinheira, tendo sido identificadas diversas bandas imunorreativas. Em cerca de metade dos casos a imunorreatividade resultou de reatividade cruzada com gramíneas. Observou-se uma resposta celular diferencial entre indivíduos com reatividade cruzada e indivíduos com reconhecimento primário.

Estes resultados sugerem que os pólenes de plátano e azinheira podem ser uma causa de polinose na região do Alentejo durante a Primavera.



## ABSTRACT

### **Immunoreactivity to allergens in pollen of maple and oak in a population of Évora with seasonal allergic respiratory disease**

This work aimed the characterization of the allergenic profile of pollen from plane (*P.hybrida*) and holm oak (*Q.rotundifolia*) trees in the region Évora.

The information on medication used in the treatment of allergy sales as well as pollen index in Évora were monitored. The allergenic profile of these pollen types were evaluated by immunoblot and cellular (RBL-h21 activation) techniques using sera from allergic patients.

A positive correlation of the anti-allergic medication sales and the pollen index was observed. A positive immunoreactivity to Platanus and Quercus was observed in all sera tested and several allergens were identified. Both specific and cross-reactive (*D. glomerata*) bands were identified in approximately half of the cases. Basophil activation test from specific and cross-reactive pools of sera has shown differential dose-response degranulation.

This results suggest that both plate and holm oak pollen might be a cause of allergy in Alentejo during the early spring



# *CAPÍTULO 1*

## *Introdução*



## 1.1. Alergia

O termo alergia foi descrito pela primeira vez em 1906 pelo pediatra australiano Clemens von Pirquet, como uma “reação específica alterada do organismo”(Sohi & Warner, 2008). A alergia era, na altura, vista como uma doença rara, no entanto, muitos dos fatores que desencadeavam a alergia tornaram-se mais evidentes com o passar do tempo (Calderon et al., 2012).

Hoje em dia, a alergia é caracterizada como uma reação exagerada do sistema imunitário, que alguns indivíduos predispostos geneticamente manifestam contra determinados antígenos presentes no meio ambiente, designados de alérgenos (Arosa, Cardoso, & Pacheco, 2007). A reação alérgica pode ocorrer em qualquer idade.

### 1.1.1. Imunidade: componentes celulares e moleculares

O sistema imunitário inclui moléculas e células especializadas que protegem o organismo dos mamíferos contra agentes invasores, possuindo diversos mecanismos de defesa. Este sistema pode ser dividido em duas componentes, determinadas pela especificidade e velocidade de resposta, denominando-se de imunidade inata e imunidade adaptativa (ver Figura 1) (McComb, Thiriot, Krishnan, & Stark, 2013).

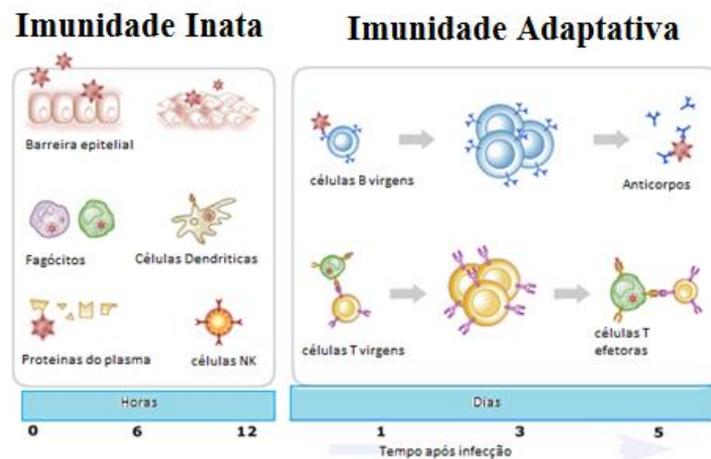


Figura 1- Células envolvidas na imunidade inata e adaptativa (adaptado de [missinglink.ucsf.edu](http://missinglink.ucsf.edu) <sup>[1]</sup>).

A imunidade inata compreende quatro tipos de barreiras: a anatômica, constituída pela pele e membranas mucosas; a barreira fisiológica, que compreende a temperatura corporal, o baixo pH e os mediadores químicos; as barreiras fagocíticas/endocíticas que são constituídas por vários tipos de células que internalizam e destroem macromoléculas exógenas; e por fim as barreiras inflamatórias, onde os danos nos tecidos e infeções provocam a libertação de proteínas no soro, que contém atividade antimicrobiana (Kindt et al., 2007).

A imunidade adaptativa é capaz de reconhecer e eliminar seletivamente microrganismos e antígenos e envolve a presença de linfócitos T e B. Este tipo de imunidade pode ser dividida em duas fases distintas: uma fase, que envolve o reconhecimento do antígeno através dos recetores específicos do antígeno em linfócitos T e B que conduzem à ativação da célula, e outra, em que os linfócitos atuam de forma a eliminar o antígeno (Kindt et al., 2007; McComb et al., 2013). Este tipo de imunidade é dotada de memória, ou seja, quando há uma segunda exposição ao mesmo antígeno, os linfócitos são capazes de reconhecer esse mesmo antígeno (Parkin & Cohen, 2001).

### **1.1.1.1. Células envolvidas na resposta imunitária**

#### **Células Dendríticas**

As células dendríticas fazem parte da imunidade inata e são as primeiras células do sistema imunitário a entrar em contacto com o antígeno na superfície das mucosas, estendendo as dendrites ao longo da barreira epitelial. Estas células processam o antígeno e apresentam-no a células especializadas do sistema imunitário (Arosa et al., 2007).

As células dendríticas estão presentes em todos os tecidos, existindo também em grande quantidade nos órgãos linfóides. Na sua membrana expressam recetores que são capazes de reconhecer padrões moleculares comuns a vários microrganismos, o que lhes permite reconhecer diferentes proteínas (Kindt et al., 2007).

#### **Macrófagos**

Os macrófagos são células fagocíticas que derivam dos monócitos quando estes penetram nos tecidos. Caracterizam-se por terem uma grande capacidade de endocitose, podendo internalizar uma variedade de antígenos, sejam estes solúveis ou parte de outras células ou microrganismos. Apesar de possuírem a mesma capacidade fagocítica, quando migram para os tecidos adquirem diferentes morfologias, tendo designações diferentes consoante o tecido onde

se encontram. Estas células expressam moléculas do complexo MHC Classe II (Kindt et al., 2007).

### **Células *Natural Killer* (NK)**

As células *Natural Killer* (NK) são linfócitos que atacam e destroem células tumorais ou células infetadas por vírus. São capazes de reconhecer e eliminar células alteradas, quer por possuírem microrganismos intracelulares, quer por poderem tornar-se uma célula maligna (Arosa et al., 2007).

### **Linfócitos T**

Os linfócitos T são produzidos na medula óssea e migram para o timo, local onde atingem a sua maturação. Durante a maturação no timo expressam uma ligação seletiva para uma molécula de antigénio, a que se dá o nome de recetor de linfócitos T (TCR), que consegue reconhecer apenas um antigénio que esteja ligado à membrana das proteínas designadas complexo de histocompatibilidade principal (MHC) do tipo I. Os linfócitos T classificam-se em linfócitos T helper (T<sub>H</sub>): CD4<sup>+</sup> e linfócitos T citotóxicas (T<sub>C</sub>): CD8<sup>+</sup>.

Os linfócitos T<sub>H</sub> são os mediadores mais importantes da memória imunológica e quando se encontram em número reduzido ou as suas funções são perdidas, o indivíduo torna-se suscetível a uma série de doenças infecciosas. Eles desempenham um papel central no sistema imunitário, prestando auxílio a todas as outras células deste sistema através da secreção de interleucinas (Zhu, Yamane, & Paul, 2010). Existem duas subpopulações de linfócitos T<sub>H</sub> (T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2) importantes no desenvolvimento da doença alérgica. Provenientes da mesma célula progenitora, os T<sub>H</sub>1 segregam as interleucinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12, enquanto as células T<sub>H</sub>2 segregam as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Kindt et al., 2007; Mesquita Júnior et al., 2010).

### **Linfócitos B**

Os linfócitos B são responsáveis pela produção de imunoglobulinas (LeBien & Tedder, 2008).

O primeiro contacto com o antigénio, que pode ocorrer por exposição ou vacinação, leva à ativação dos linfócitos B *naive*, que se vão diferenciar em plasmócitos produtores de anticorpos e em células de memória. Quando entram em contacto a segunda vez com o antigénio, os linfócitos B já são capazes de reconhecer esse antigénio devido à expansão clonal

e às células B de memória, que foram geradas na resposta primária (Mesquita Júnior et al., 2010).

Os linfócitos B também funcionam como células apresentadoras de antígeno, após interiorizarem e processarem o antígeno ligado.

### **Neutrófilos**

Os neutrófilos são produzidos por hematopoiese na medula óssea. São as células essencialmente fagocíticas que possuem a capacidade de responder de forma rápida, no início de qualquer processo de alteração, inflamação ou lesão nos tecidos (Kindt et al., 2007).

### **Mastócitos**

Os mastócitos são células inflamatórias dos tecidos, têm origem hematopoiética e respondem a sinais de imunidade inata e adquirida com liberação imediata e tardia de mediadores inflamatórios. Encontram-se localizados principalmente em associação com os vasos sanguíneos e nas superfícies epiteliais. Os mastócitos desempenham um papel crucial nas reações alérgicas, mas também estão implicados na resposta do hospedeiro a agentes patogênicos, doenças autoimunes, fibrose e cicatrização (Stone, Prussin, & Metcalfe, 2010).

Os precursores dos mastócitos são formados na medula óssea durante a hematopoiese, circulam no sangue, migrando para os tecidos periféricos, onde completam a sua maturação, tornando-se células com numerosos grânulos citoplasmáticos. Estes grânulos armazenam uma variedade de moléculas mediadoras incluindo histamina, heparina e proteases (Galli, 2014; Kindt et al., 2007). Quando ocorre desgranulação, os mastócitos libertam outros mediadores que não se encontram armazenados, mas que são sintetizados pelas células ativadas, incluindo leucotrienos, prostaglandinas, interleucinas, quimiocitocinas e fatores de crescimento (Galli, 2014).

Os mastócitos expressam recetores transmembranares de elevada afinidade para a IgE (FcεRI) que se ligam fortemente à porção Fe das IgE (Galli, 2014). Quando um alérgeno se encontra ligado a duas IgE, ocorre desgranulação dos mastócitos e produção de uma reação de hipersensibilidade imediata que pode ser local ou sistémica (Jr, P, M, & Shlochick, 2001).

Na tabela 1 descrevem-se os principais efeitos biológicos dos diversos mediadores libertados pela desgranulação de mastócitos.

Tabela 1 - Efeitos biológicos dos produtos libertados pelos mastócitos (adaptado de Galli, 2014).

	Produtos	Efeitos Biológicos
Armazenada em grânulos e secretada após ativação (em minutos)	Histamina	Aumenta a permeabilidade vascular e dilata os vasos sanguíneos; Contratura das vias aéreas; Provoca prurido e dor; Influência a resposta imune;
	Heparina	Anticoagulante; Necessária para o armazenamento de outros produtos em grânulos;
	Proteases (tripsina, etc)	Degradam certas proteínas e péptidos; Regulam a remodelação do tecido; Convertem a angiotensina I em angiotensina II;
	Mediadores lipídicos (leucotrienos, prostaglandinas, etc)	Regulam a migração e função dos leucócitos; Aumentam a permeabilidade vascular; Induzem contração ou dilatação dos vasos sanguíneos (dependendo do tipo de mediador); Contraem ou relaxam o músculo liso; Aumentam a secreção do muco;
	Interleucinas, quimiocinas, fatores de crescimento de péptidos	Têm muitos efeitos noutras células (tanto em leucócitos como em células estruturais) que podem promover ou suprimir a inflamação e/ou remodelação do tecido;

### Basófilos

Os basófilos são granulócitos que circulam no sangue da maioria dos vertebrados e estão envolvidos principalmente em reações de hipersensibilidade e reações anafiláticas (Chirumbolo, 2012). Representam cerca de 0,5%-1 % dos glóbulos brancos circulantes nos seres humanos, sendo muito semelhantes aos mastócitos (Kindt et al., 2007). Ao contrário dos mastócitos, os basófilos circulam na corrente sanguínea e raramente se encontram presentes nos tecidos periféricos sob condições homeostáticas (Arosa et al., 2007).

À semelhança dos mastócitos, os basófilos contêm na sua membrana recetores e, por ativação de interleucinas ou de antigénios, libertam histamina e IL-4 a partir dos seus grânulos.

A tabela 2 apresenta as principais diferenças entre mastócitos e basófilos.

Tabela 2 - Características principais dos mastócitos e basófilos (adaptado de Hajime Karasuyma, 2014).

	<b>Mastócitos</b>	<b>Basófilos</b>
<b>Origem</b>	Células tronco hematopoiéticas	Células tronco hematopoiéticas
<b>Local de maturação</b>	Tecidos conjuntivos	Medula óssea
<b>Vida útil</b>	Meses	Dias
<b>Local primário</b>	Tecidos	Circulação intravascular
<b>Tamanho</b>	6-12 $\mu\text{m}$	5-7 $\mu\text{m}$
<b>Núcleo</b>	Oval e redondo	Segmentado
<b>Grânulos</b>	Mais pequenos e mais numerosos comparados com os basófilos	Maiores e menores quando comparados com os mastócitos
<b>Peptidoglicanos</b>	Heparina e sulfatos de condroitina	Predominantemente sulfatos de condroitina
<b>Conteúdo em triptase</b>	Elevada	Baixa
<b>Mediadores lipídicos</b>	PGD <sub>2</sub> , LTB <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , LTE <sub>4</sub> , PAF	LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , LTE <sub>4</sub>

### Eosinófilos

Os eosinófilos são células multifuncionais, ou seja, atuam tanto na imunidade inata como na imunidade adaptativa. Estas células produzem e armazenam biologicamente moléculas ativadas, incluindo proteínas citotóxicas, mediadores lipídicos, péptidos quimiotáticos e citocinas (Kindt et al., 2007). Nas reações alérgicas, são as principais células efetoras, estando sob influência da IL-5, possivelmente com origem em células T<sub>H</sub>2 ativadas (Arosa et al., 2007).

#### 1.1.1.2. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são macromoléculas de natureza proteica formadas por uma ou mais unidades estruturais básicas. São produzidas pelos linfócitos B, no seu estado maduro, em resposta a antígenos (Rižner, 2014). Os anticorpos humanos encontram-se agrupados em cinco classes distintas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), de acordo com a sua função biológica, sendo que o sistema imunitário pode produzir todas estas classes em resposta a uma substância invasora (Kindt et al., 2007).

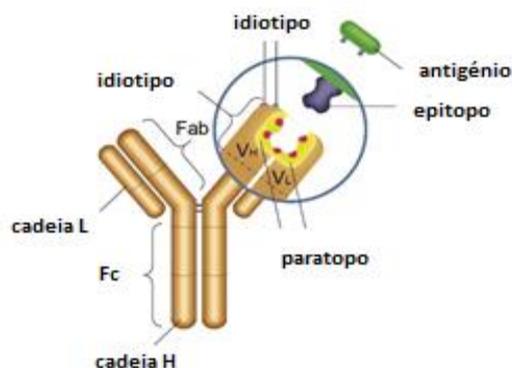


Figura 2 - Representação de uma imunoglobulina (adaptado de static.abdsrotec.com<sup>[2]</sup>).

Na sua estrutura, as imunoglobulinas (ver Figura 2) possuem quatro cadeias peptídica divididas em duas cadeias leves idênticas, com um peso molecular de 25 kDa e duas cadeias pesadas idênticas com um peso molecular entre os 53

e 75 kDa (John B. Zabriskie, 2009). A sua estrutura quarternária apresenta-se em forma de “Y”. As cadeias pesadas encontram-se ligadas por uma ou mais ligações dissulfureto para formar a base do Y, denominada de região Fc. As porções das cadeias que não ficam ligadas são livres e constituem os braços flexíveis do Y, denominando-se cada deles, domínio Fab (Kindt et al., 2007).

A Tabela 3 apresenta as principais diferenças entre as várias classes de imunoglobulinas.

Tabela 3 –Propriedades das diferentes classes de imunoglobulinas (adaptado de Júnior et al., 2010).

Classe	Estrutura	Propriedades
IgA	Dimérica	Encontra-se em mucosas do trato gastrointestinal, respiratório e urogenital
	Monomérica	Protege o organismo contra agentes patogénicos. Encontra-se na saliva, lágrimas e leite
IgD	Monomérica	Imunoglobulina de membrana. Faz parte do recetor de membrana nos linfócitos B <i>naive</i> (BCR)
IgE	Monomérica	Encontra-se envolvida em processos de resposta alérgica. Quando interage com basófilos e mastócitos, provoca libertação de histamina,
IgG	Monomérica	É a principal imunoglobulina da imunidade adquirida. Possui a capacidade de atravessar a barreira placentária.
IgM	Monomérica	Faz parte dos recetores de membrana dos linfócitos B virgens <i>naive</i> (BCR)
	Pentamérica	É a primeira a ser segregada na resposta imunitária adquirida. É a forma encontrada no sangue.

Os anticorpos IgE medeiam as reações de hipersensibilidade imediata, que são responsáveis pelos sintomas alérgicos (Kindt et al., 2007).

A IgE pode ligar-se a um recetor de baixa afinidade (FcεRII, CD23) que se expressa na superfície das células B, bem como noutras células hematopoiéticas, e a recetores de elevada afinidade (FcεRI), que se expressam em mastócitos e basófilos (Stone et al., 2010).

### 1.1.1.1. Interleucinas

As interleucinas, que pertencem à família das citocinas, são proteínas ou péptidos solúveis que são produzidos em resposta a antígenos, atuando como mensageiros do sistema imunitário. Têm como função induzir o crescimento e diferenciação de linfócitos, ativação de células efetoras e o desenvolvimento de células hematopoiéticas (Kindt et al., 2007). Na Tabela

4 encontram-se representadas algumas citocinas envolvidas na imunidade inata e na imunidade adquirida.

Tabela 4 - Grupos funcionais de citocinas selecionadas (Kindt et al., 2007).

<b>Citocinas envolvidas na imunidade inata</b>		
<b>Citocinas</b>	<b>Segregada por</b>	<b>Alvos e efeitos</b>
<b>Interleucina 1 (IL1)</b>	Monócitos, Macrófagos, células endoteliais, células epiteliais	Vascular (Inflamação) Hipotálamo (febre) Fígado (Indução de proteínas de fase aguda)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Macrófagos	Vascular (Inflamação) Fígado (Indução de proteínas de fase aguda) Perda de massa muscular, gordura corporal; Indução de morte em muitos tipos de células Ativação de neutrófilos
<b>Interleucina 12 (IL12)</b>	Macrófagos e células dendríticas	Células NK Influência a imunidade adaptativa
<b>Interleucina 6 (IL6)</b>	Macrófagos e células endoteliais	Fígado (Indução de proteínas de fase aguda) Influência a imunidade adaptativa
<b>Interferão <math>\alpha</math> (INF-<math>\alpha</math>)</b>	Macrófagos	Induz um estado antiviral na maioria das células nucleadas Aumenta a expressão das MHC classe I Ativa as células NK
<b>Interferão <math>\beta</math> (INF-<math>\beta</math>)</b>	Fibroblastos	Induz um estado antiviral na maioria das células nucleadas Aumenta a expressão das MHC classe I Ativa as células NK
<b>Citocinas envolvidas na imunidade adaptativa</b>		
<b>Citocinas</b>	<b>Segregada por</b>	<b>Alvos e efeitos</b>
<b>Interleucina 2 (IL2)</b>	Células T	Proliferação das células T Ativação e proliferação de células NK Proliferação de células B
<b>Interleucina 4 (IL4)</b>	Células T <sub>H2</sub> , mastócitos	Promove a diferenciação das células T <sub>H2</sub>
<b>Interleucina 5 (IL5)</b>	Células T <sub>H2</sub>	Geração e ativação de eosinófilos
<b>Interleucina 25</b>	Desconhecida	Induz secreção de citocinas das T <sub>H2</sub>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Células T, macrófagos e outros tipos de células	Inibe a função efetora e de proliferação das células T Inibe a proliferação de células B Inibe os macrófagos
<b>Interferão <math>\gamma</math> (INF-<math>\gamma</math>)</b>	Células T <sub>H1</sub> , células CD8+, células NK	Ativa os macrófagos Aumenta a expressão de moléculas MHC classe I e II Aumenta a apresentação do antígeno

### 1.1.2. Reações de hipersensibilidade do tipo I

As reações de hipersensibilidade do tipo I, também conhecidas como reações de hipersensibilidade imediata, são reações induzidas por um determinado tipo de antígenos, denominados de alérgenos. Caracteriza-se por ser uma reação rápida que origina um aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e contração do músculo brônquico e visceral, seguindo-se uma reação inflamatória.

Este tipo de reação ocorre em indivíduos que se encontram mais suscetíveis para as desenvolver, sendo chamados de indivíduos atópicos. As reações de hipersensibilidade do tipo I requerem em duas fases (Figura 3): a fase de sensibilização e a fase efetora.

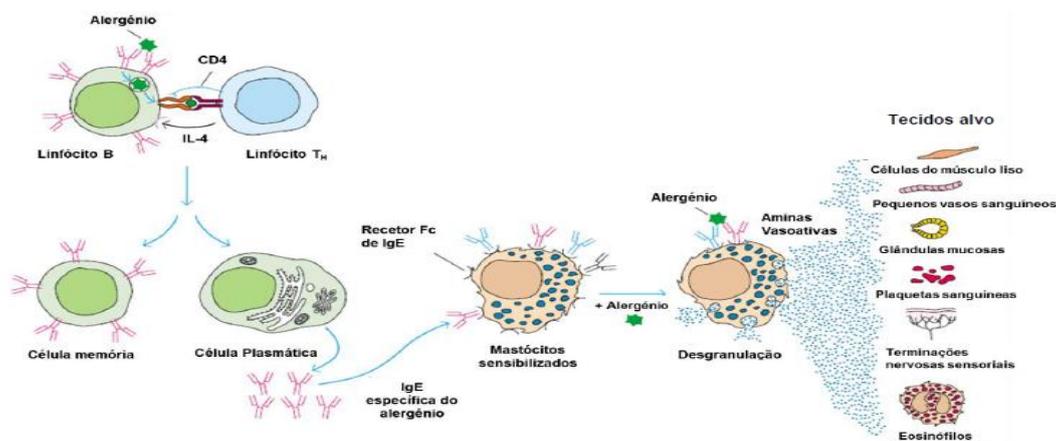


Figura 3 - Mecanismo geral das reações de hipersensibilidade do tipo I (adaptado de kindt et al., 2007).

#### 1.1.2.1. Fase de sensibilização

Neste tipo de reação as células do plasma segregam IgE em resposta à ativação por células  $T_H2$ . A IgE liga-se com elevada afinidade aos receptores  $Fc\epsilon RI$  presentes nos mastócitos e basófilos. Assim, os basófilos e mastócitos ficam sensibilizados. Uma exposição mais tardia ao mesmo alérgeno vai provocar desgranulação destas células.

A fase de sensibilização ocorre quando há um primeiro contacto com o alérgeno. Ao contactar com a mucosa respiratória ou oral, o alérgeno vai ser endocitado por células apresentadoras de antígeno (APC) (ver Tabela 5), particularmente pelas células dendríticas e pelos macrófagos. Estas células tem a capacidade de migrar para os gânglios linfáticos drenantes e para zonas do tecido linfóide ligado às mucosas (Arosa et al., 2007).

Tabela 5 – Características principais das células apresentadoras de antígeno (retirado de Arosa et al., 2007).

Características	Células Dendríticas		Macrófagos		Linfócitos B	
	Imaturas	Maduras	Quiescentes	Ativados	Quiescentes	Ativados
<b>Internalização de Antígeno</b>	Endocitose (+++++)	Endocitose (+++)	Fagocitose (+++++)	Fagocitose (+++)	Endocitose (+++)	Endocitose (+)
<b>Expressão de MHC II</b>	Constitutiva (+++)	Constitutiva (+++++)	Induzível (+)	Induzível (+++)	Constitutiva (+)	Constitutiva (+++)
<b>Expressão de B7 (CD 80/ CD 86)</b>	Constitutiva (+++)	Constitutiva (+++++)	Induzível (+)	Induzível (+++)	Induzível (+)	Induzível (+++)
<b>Expressão de CD40</b>	Induzível (+)	Induzível (+++)	Induzível (+)	Induzível (+++)	Constitutiva (+++)	Constitutiva (++++)
<b>Ativação de Linfócitos T</b>	<i>Naive</i> Efetoras de memória	<i>Naive</i> Efetoras de memória	(-)	Efetoras de memória	Efetoras de memória	<i>Naive</i> Efetoras de memória

Nos gânglios linfoides, as APC vão apresentar os péptidos degradados ao complexo “major” de histocompatibilidade (MHC) da classe II. Os linfócitos T<sub>H</sub> com especificidade para esses péptidos vão reconhecê-los, caso a apresentação de antígeno seja efetuada de forma correta. Como consequência dessa interação, os linfócitos T<sub>H</sub> vão ficar ativados, proliferar e iniciar a produção de interleucinas, nomeadamente IL4, IL5 e IL13. A IL4 e IL13 que vão induzir a mudança de classe na cadeia pesada  $\epsilon$  da imunoglobulina, nos linfócitos B, e a produção de anticorpos IgE específicos ao alérgeno. Assim, as moléculas de IgE vão entrar em circulação e ligar-se aos recetores de alta afinidade que se encontram presentes nas membranas dos mastócitos e basófilos (Kindt et al., 2007).

Por outro lado, a IL5 é um dos principais fatores ativadores de eosinófilos. Estas células são um dos grandes marcadores nas reações alérgicas e têm funções mistas, pois são células efetoras que participam na imunopatologia e inflamação das doenças alérgicas, mas também têm algumas características anti-inflamatórias (Arosa et al., 2007).

As APC migram para zonas do tecido linfóide e apresentam antígenos às células efetoras e moduladoras do sistema imunitário. A apresentação de antígenos processados, assim como a eficiência desta apresentação na ativação de populações de linfócitos T específicas, vai depender em grande parte do tipo de células envolvidas no processamento e apresentação. Entre elas encontram-se células dendríticas, os linfócitos B e os macrófagos (Arosa et al., 2007).

### **1.1.2.2.Fase efetora**

A fase efetora ocorre quando há um segundo contacto com o alergénio ao qual o indivíduo tenha ficado sensibilizado. Neste caso, como já há uma percentagem elevada de moléculas de IgE ligadas à superfície dos mastócitos, ocorre a ligação de duas ou mais moléculas de IgE adjacentes a determinantes antigénicos presentes no antigénio. A ligação transversal das moléculas de IgE ao alergénio induz os mastócitos e basófilos a deslocarem os seus grânulos para a membrana plasmática, libertando o seu conteúdo para o meio extracelular, num processo conhecido como desgranulação. Como resultado, vão ser libertadas substâncias farmacologicamente ativas, que vão dar origem a manifestações alérgicas (Arosa et al., 2007; Kindt et al., 2007).

Na fase efetora, podem ainda ser distinguidas em duas fases: a fase imediata e a fase tardia. A fase imediata ocorre quando há ligação do alergénio às moléculas de IgE que se encontram presentes nas superfícies das células, resultando na ativação da membrana dos mastócitos, o que vai permitir a entrada de iões  $Ca^{2+}$  através a membrana e desencadear dois processos: primeiramente a exocitose dos grânulos contidos nos mastócitos, com a libertação de grandes quantidades de mediadores que existem no estado de pré-formados, como as histaminas, enzimas proteolíticas, heparinas e fatores quimiotáticos (Goldstein & Dembo,1982).

A fase tardia ocorre algumas horas mais tarde (entre 8 a 12horas) e é causada pela síntese induzida e libertação de mediadores, que incluem os leucotrienos, quimiocinas e citoquinas a partir dos mastócitos ativados. Estes vão recrutar outros leucócitos, incluindo os eosinófilos e as células  $T_H2$ , que vão libertar no seu ambiente diferentes interleucinas. As IL4 e IL13 vão manter a reação alérgica, ativar os linfócitos B, e assim, a síntese de IgE. Os eosinófilos vão ser ativados pelas IL3 e GM-CSF (fator de crescimento das colónias granulócito-macrofágicas) e, por sua vez, libertam mediadores inflamatórios, que vão ser responsáveis por uma nova manifestação alérgica.

### **1.1.2.3.Natureza dos alergénios e reatividade cruzada**

Os alergénios pertencem a famílias diferentes de proteínas, de acordo com as suas características intrínsecas. Os membros que pertencem à mesma família de proteínas podem partilhar epítomos que são reconhecidos pelas mesmas IgE, e que por isso podem desencadear reações alérgicas resultantes de reatividade cruzada (Kindt et al., 2007).

A Figura 4 mostra um exemplo de uma reação cruzada entre Bet v 1 e Mal d 1, onde epítomos homólogos são reconhecidos pelas mesmas IgE. Proteínas com sequências de aminoácidos semelhantes (indicadas com as linhas vermelha e verde), são processadas pelas células apresentadoras de antigénio de forma semelhante. A sublinhado encontram-se os

resíduos de aminoácidos semelhantes, que por ativação das células T, induzem proliferação e produção de citocinas (Bohle, 2014).

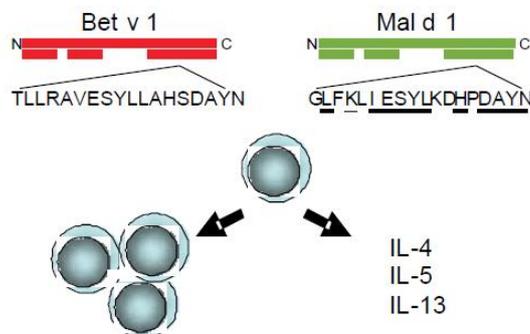


Figura 4 – Exemplo de um mecanismo de reatividade cruzada (retirado de Bohle, 2014).

A relevância clínica da reatividade cruzada parece ser influenciada por vários fatores incluindo o hospedeiro (resposta imunitária contra hospedeiro), a exposição e o alergénio. As reações alérgicas requerem geralmente uma exposição repetida ao alergénio. Desta forma, os níveis de IgE e a sua afinidade constituem aspetos importantes para a ocorrência de reatividade cruzada. As características estruturais das proteínas são também um fator determinante para a ocorrência deste fenómeno (Ferreira, Hawranek, Gruber, Wopfner, & Mari, 2004).

### 1.1.3. Terapêutica medicamentosa na alergia

Os medicamentos utilizados para o tratamento das doenças alérgicas atuam a vários níveis da cascata imunopatológica destas doenças. Alguns são utilizados para contrariar os efeitos de mediadores sobre recetores celulares, enquanto outros tem por objetivo a diminuição da libertação de mediadores dos mastócitos (Arosa et al., 2007). Para a terapêutica medicamentosa são geralmente utilizados anti-histamínicos, corticosteroides e simpaticomiméticos (Infarmed, 2016).

O uso de anti-histamínicos proporciona o alívio de sintomas, no entanto, a longo prazo a sua utilização tem potenciais efeitos secundários, podendo deixar de ser benéficos. O uso de anti-histamínicos pode reduzir os sintomas de rinorreia e espirros, mas causar sonolência (Pandey, 2016).

No que diz respeito aos corticosteroides, os glucocorticoides são os medicamentos mais eficazes no tratamento das doenças alérgicas. Existem vários estudos que demonstram que este

tipo de medicação melhora de forma significativa os sintomas de asma brônquica, rinite alérgica e outras doenças alérgicas. Em termos de mecanismos imunomoduladores, os corticosteroides inibem significativamente a inflamação alérgica asmática, ao atuarem sobre vários tipos de células inflamatórias, nomeadamente em termos da produção de interleucinas (Arosa et al., 2007).

Dentro dos medicamentos simpaticomiméticos encontram-se a adrenalina ou epinefrina, que é utilizada no tratamento de emergência das reações de anafilaxia. Os indivíduos que fazem reações alérgicas graves a picadas de insetos ou a outros alérgenos devem possuir seringas de adrenalina prontas para autoinjeção por via intramuscular (Infarmed, 2016).

#### **1.1.4. Métodos usados no diagnóstico de alergias**

##### **1.1.4.1. Teste in vivo - *skin prick test* – SPT**

Os testes cutâneos por picada (ou *skin prick test* - SPT) representam o primeiro método de diagnóstico em indivíduos com história clínica sugestiva de rinite alérgica e/ou asma, sendo utilizados para demonstrar uma reação alérgica imediata, mediada por IgE (Bousquet et al., 2012). São frequentemente utilizados, pois para além de serem de fácil execução, permitem um diagnóstico rápido (Genser & Schmid-Grendelmeier, 2014). Tem a desvantagem de provocar incómodo ao doente e de não poder ser realizado em crianças com menos de 6 anos. O tipo de alérgenos a testar é decidido com base na história clínica (Berger, 2002).

Neste tipo de teste a pele do indivíduo é inoculada uma pequena gota de vários alérgenos, de forma a perceber qual é que provoca reação alérgica no doente (ver Figura 5). São ainda utilizadas duas amostras que servem de controlo, uma em que o controlo irá causar reação em todos os pacientes e o outro não deverá causar qualquer reação. Como consequência da administração dos alérgenos, vai haver formação de uma pápula, que é medida, sendo a sua dimensão um possível indicador da severidade da doença (Berger, 2002).



Figura 5- Exemplo de um teste PRICK (retirado de [allergyclinic.co.uk](http://allergyclinic.co.uk) [3]).

#### 1.1.4.2. *Radio-allergosorbent test (RAST) e Enzyme-Allergosorbent test (EAST)*

O *radio-allergosorbent test* (RAST) foi descrito pela primeira vez em 1967 (Cramer, 2014), permitindo quantificar níveis de IgE específicos para alérgenos (Pakrasić, Andersson, & Norling, 2002). O alérgeno era imobilizado numa fase sólida e as múltiplas moléculas de alérgeno reagiam com os anticorpos IgE específicos presentes numa amostra de soro de um indivíduo alérgico. Os anticorpos anti-IgE, marcados radioativamente ligavam-se à IgE específica do indivíduo, formando um complexo. Posteriormente media-se a radioatividade do complexo, mediante um contador gama (Cramer, 2014).

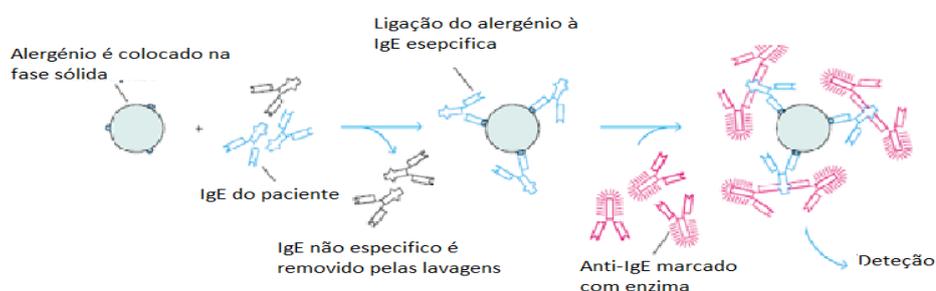


Figura 6– Esquema ilustrativo da técnica EAST (adaptado de Arosa et al., 2007).

Atualmente, esta técnica foi substituída pela EAST (*enzyme-allergosorbent test*) (Figura 6). O princípio desta técnica é semelhante ao RAST, no entanto, em vez de se utilizar um radioisótopo, utiliza-se um anticorpo anti-IgE conjugado com um enzima. Após a adição de substrato, é possível medir a fluorescência do eluído. Quanto mais alto o valor da resposta, maior a presença de IgE específica na amostra.

Estas técnicas fornecem-nos informações semelhantes aos testes cutâneos por picada, não são afetados por medicamentos e indicam um resultado quantitativo. São muito úteis nos casos em que os indivíduos não cooperem na execução de testes cutâneos. No entanto, quando comparado com o teste cutâneo por picada, é menos sensível e muito mais dispendioso.

#### 1.1.4.3. **ImmunoCap**

O teste ImmunoCap combina um biochip e um alérgeno natural e recombinante purificado. A tecnologia baseia-se na capacidade de ligação total dos anticorpos a este antígeno, conseguida através de uma elevada capacidade de ligação. Assim, é assegurada a

ligação de todos os anticorpos relevantes, independentemente da sua afinidade ao antígeno (citado de phadia.com<sup>[4]</sup>).

Existem vários tipos de ImmunoCap, sendo que o ImmunoCap - *Total IgE* possibilita a análise da sensibilização a alérgenos permitindo o diagnóstico clínico de alergias mediadas por IgE. Um outro tipo, o ImmunoCap - *Specific IgE*, tem por objetivo diferenciar pacientes atópicos de não atópicos e dispõe de 650 alérgenos diferentes e 90 componentes de alérgenos, permitindo detetar de forma sensível e exata IgE específicas para determinados alérgenos (citado de phadia.com<sup>[4]</sup>).

Existe ainda um dispositivo que permite, com base nos testes anteriores, um diagnóstico em minutos, embora semi-quantitativo, para uma bateria de 10 alérgenos (ver Figura 7), designado de ImmunoCap - *Rapid*. Este dispositivo gera um perfil de IgE fiável e de fácil compreensão (citado de phadia.com<sup>[4]</sup>).

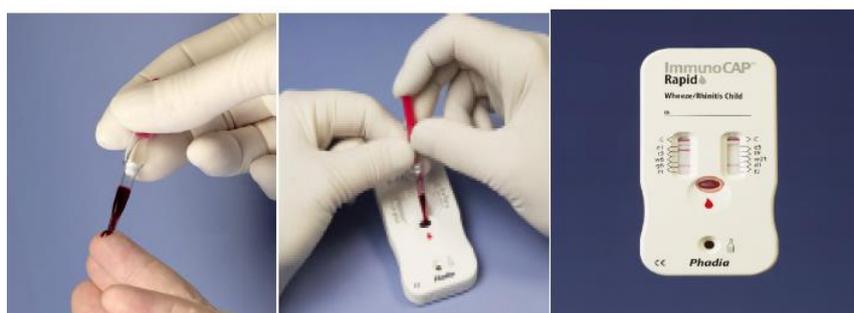


Figura 7 – Ilustração do teste ImmunoCap - *Rapid* (adaptado de phadia.com<sup>[4]</sup>).

#### 1.1.4.4. Testes de ativação de basófilos

Os métodos imunoquímicos anteriormente apresentados dependem da ligação da IgE a moléculas que se encontram ligadas a suportes sólidos, o que pode alterar a integridade estrutural dos alérgenos e assim modificar os epítopos relevantes que induzem sintomas alérgicos *in vivo* (Vogel, Lüttkopf, Hatahet, Haustein, & Vieths, 2005). Para além disso, os métodos imunoquímicos não fornecem informações sobre a capacidade de uma proteína induzir reações alérgicas, como acontece com os testes *in vivo*.

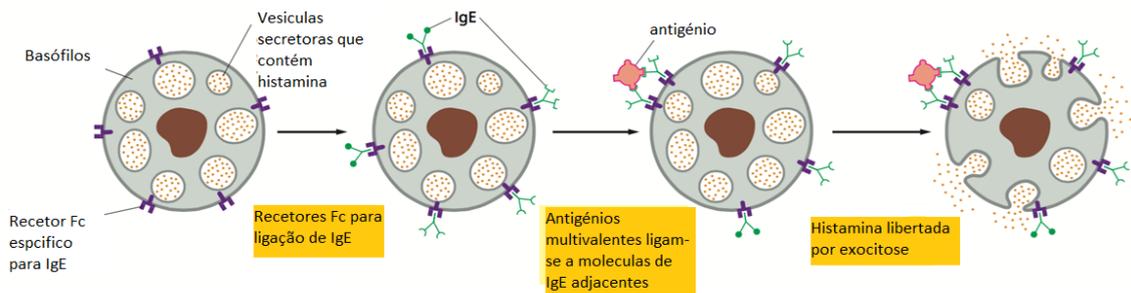


Figura 8 - Esquema ilustrativo do teste de ativação de basófilos (Adaptado de raphaels7.wordpress.com <sup>[5]</sup>).

De forma a ultrapassar os problemas associados aos métodos imunológicos, foram desenvolvidos testes funcionais em basófilos de indivíduos com sintomatologia alérgica, que procuram quantificar a resposta celular a um determinado estímulo (Figura 8) (Hoffman, 2014).

Para ultrapassar o inconveniente de ter que obter basófilos de indivíduos para a realização do teste, o que gerava alguma diversidade de resposta, foi desenvolvida uma linha celular contínua de basófilos de rato que expressam o recetor de elevada afinidade da IgE humana (Vogel et al., 2005).

O teste de ativação de basófilos é realizado através da medição da libertação de histamina ou por libertação de outros mediadores em resposta à exposição do alérgico (ver Figura 8) (Hoffman, 2014).

Este tipo de teste é utilizado quando o historial do doente e as IgE específicas ou os PRICK são discordantes, ou se o historial do doente indica que os testes cutâneos por picada possam provocar alguma reação sistémica (Hoffman, 2014).

## 1.2. Polinose (alergia ao pólen)

A polinose, também conhecida como febre do feno, é uma desordem comum que pode ser uma importante causa de morbilidade (Darrow et al., 2012). A maior parte dos indivíduos que sofrem de polinose, apresentam manifestações clínicas ao nível do sistema respiratório, como rinorreia, espirros, obstrução das vias nasais para conjuntival, prurido faríngeo e lacrimejo, que podem tornar-se mais graves com a exposição anual ao pólen (Jianan, Zhiyun, Hua, Xiaoke, & Hong, 2007; Pandey, 2016).

A sensibilização aos alérgicos pode ocorrer de forma isolada ou associada a outros alérgicos perenes, como alérgicos de ácaros. Deste modo a sintomatologia pode ocorrer exclusivamente na Primavera, durante a época polínica ou durante todo o ano (Taketomi, Ferreira, Moreira, Assis, & Vieira, 2006b).

A alergia ao pólen possui um impacto muito importante na Europa e há evidências que, nas últimas décadas, tem aumentado a sua prevalência, especialmente na Europa Ocidental, nos países industrializados (Rodríguez -Rajo et al., 2010)

A polinose e a geografia estão intimamente ligadas, pois tanto a distribuição das plantas alergizantes como das populações expostas são os fatores que mais influenciam a existência deste fenómeno (Alcaraz, 1996).

### 1.2.1. Tipos polínicos alergizantes em Portugal

Entre as plantas mais alergizantes, encontram-se essencialmente três grupos: as árvores que possuem uma polinização dominante no final do Inverno e início da Primavera, onde se destacam as famílias das *Cupressaceae*, *Corylaceae*, *Oleaceae*, *Pinaceae*, *Platanaceae*, *Fagaceae* e *Betulaceae*; as ervas, que incluem as diferentes espécies de gramíneas e polinizam predominantemente na Primavera e início de Verão, e finalmente, o grupo de plantas silvestres ou chamadas ervas daninhas e arbustos com polinização, que se inicia na Primavera, se estende por todo o Verão e início do Outono e que incluem famílias como as *Urticaceae*, *Compositae*, *Chenopodeaceae* e *Plantaginaceae*.

Em Portugal, os grãos de pólen com contagens mais elevadas pertencem às famílias das *Gramineae*, *Oleaceae*, *Fagaceae*, *Pinaceae*, *Cupressaceae*, *Platanaceae* e *Urticaceae* (Todo-bom, Nunes, & Caeiro, 2004).

De acordo com um estudo realizado entre os anos 2002-2004 por Todo-bom *et al*, as cidades do Sul de Portugal apresentam valores de contagens polínicas mais elevadas, sendo que Évora é a cidade que apresenta contagens máximas, quando comparada com as outras cidades estudadas (Porto, Lisboa, Coimbra e Portimão). Este estudo evidencia também que, em relação aos tipos polínicos dominantes em cada uma das regiões estudadas, a análise dos valores percentuais de pólen para o ano 2004

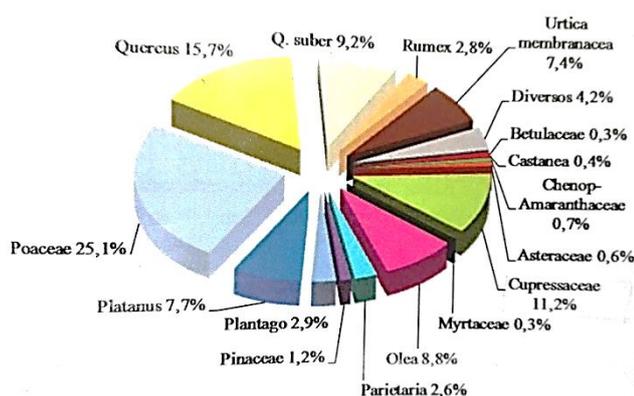


Figura 9 - Valores percentuais de tipos polínicos na região de Évora (retirado de Caeiro, 2013).

para cada espécie, revela que apesar das espécies mais alergizantes estarem representadas em todo o território nacional, existem espécies específicas de cada região que devem ser consideradas na avaliação dos indivíduos alérgicos (Todo-bom et al., 2004). No que diz respeito aos meses de Inverno,

nomeadamente a Janeiro e Fevereiro, são observadas contagens muito elevadas para *Cupressaceae* e *Urtica*. A partir do mês de Março e durante toda a Primavera, foram observadas contagens elevadas de *Pinus*, *Quercus*, *Parietaria*, *Poacea*, *Olea*, *Platanus Rumex*, *Plantago* e *Compositae* (Todo-bom et al., 2004).

Na cidade de Évora, embora se observem valores elevados de diversos tipos polínicos, os da família das gramíneas, da azinheira, do sobreiro e da oliveira são os que mais se destacam devido aos valores percentuais que atingem (ver Figura 9). De acordo com um estudo realizado por Caeiro, 2013, os pólenes provenientes da família de *Poaceae* e do género *Quercus* são os mais predominantes na cidade de Évora, constituindo cerca de 25,1% e 24,9% do pólen total anual, respetivamente (ver Figura 10).

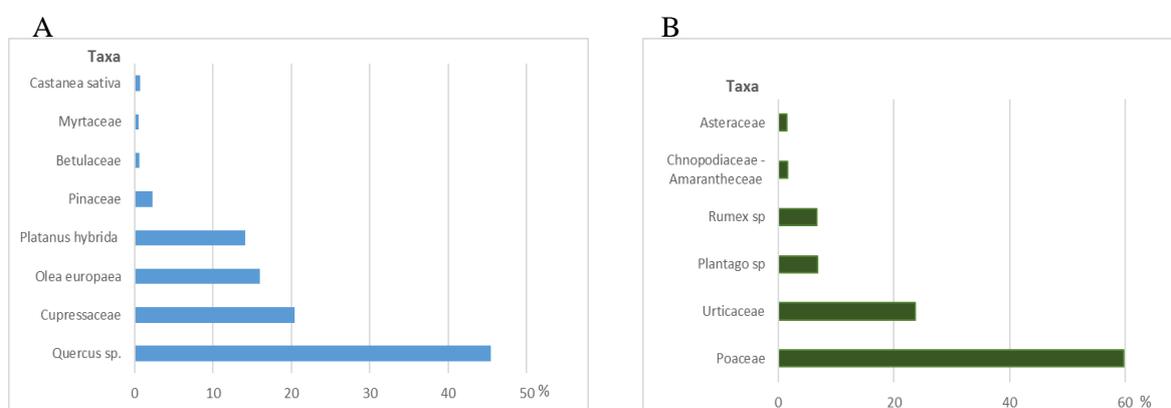


Figura 10 - Taxa de arbóreos (A) e Taxa de herbáceos (B) de Évora entre o ano 2001 e 2008 (adaptado de Caeiro, 2013).

### 1.2.1.1. Gramíneas – “*Dactylis glomerata*”

As gramíneas pertencem a uma vasta família de plantas com flor, tecnicamente designada *Poaceae* (ou *Gramineae*), de distribuição cosmopolita, constituída por 650-700 espécies e cerca de 1200 espécies (Caeiro & Nunes, 2014). A morfologia típica de uma gramínea é muito semelhante em todas as espécies (citado de uc.pt<sup>[6]</sup>).

As plantas da família *Poaceae* são as principais fontes de alérgenos de pólen de gramíneas, devido à sua ampla distribuição mundial e à sua grande capacidade de produção de pólen (Taketomi, Ferreira, Moreira, Assis, & Vieira, 2006a).



Figura 11 - Imagem representativa da flor de *D. glomerata* (retirado de flora-on<sup>[7]</sup>).

A *D. glomerata* (ver Figura 11) é uma gramínea perene comum e está entre as espécies com maior poder alergénico. É nativa da Europa, Ásia e norte de África e encontra-se frequentemente em bordas de floresta, pastagens e prados (Parveen, Winters, Threadgill, Hauck, & Morris, 2008). Esta gramínea pertence à classe *Magnoliopsida* e subclasse *Commelinidae* e reproduz-se por polinização anemófila. Apesar da floração das gramíneas ter lugar durante todo o ano, na maioria das espécies esta ocorre nos meses de Maio e Junho e é afetada por parâmetros meteorológicos, sendo a temperatura um dos fatores mais importantes para a polinização desta espécie (Tormo-Molina, Maya-Manzano, Silva-Palacios, Fernández-Rodríguez, & Gonzalo-Garijo, 2015).

### 1.2.1.2. Plátano – “*Platanus hybrida*”

O Plátano é uma planta arbórea, utilizada como sobra ornamental, que se encontra geralmente em parques, praças, jardins, passeios, margens de estrada, ruas e cursos de água, sendo mais abundante em solos profundos e frescos (Rede Portuguesa de Aerobiologia, 2015). O nome específico *hybrida* resulta do provável cruzamento entre as espécies, *Platanus orientalis* da Europa-Ásia e *Platanus occidentalis* do Norte da América. É uma das árvores mais

observadas no oeste da Europa devido à sua resistência a doenças e à poluição ambiental, apresenta um crescimento rápido e é amplamente utilizada com fins ornamentais (Arilla et al, 2005). Em Portugal esta árvore encontra-se amplamente distribuída (ver Figura 12 A).

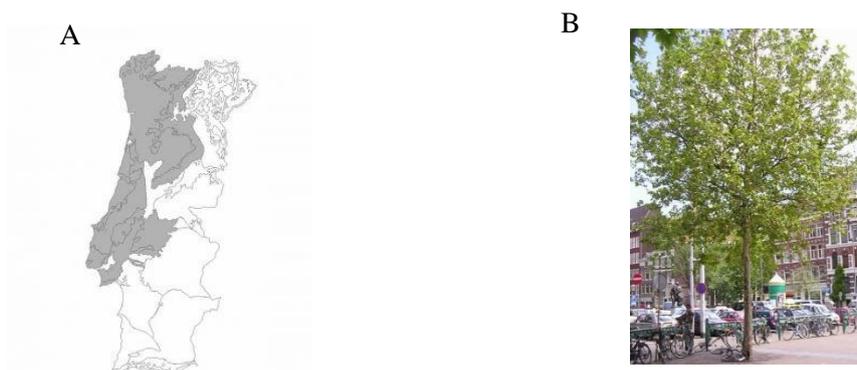


Figura 12 - Distribuição geográfica de plátano em Portugal (A) (retirado de “jardim botânico utad | platanus hispânica,”<sup>[8]</sup>); imagem de uma árvore de plátano (retirado de [allergome.org](http://allergome.org)<sup>[9]</sup>)

O plátano é uma planta anemófila, que liberta uma grande quantidade de pólen, tendo este elevadas contagens no ar do sul da Europa, incluindo Portugal e Espanha (P Alcázar et al., 2011). A época polínica do pólen de plátano é curta e intensa, ocorrendo entre Março e Abril. O pólen aparece abruptamente no ar e o pico da sua contagem ocorre usualmente uma semana

após o início da época polínica (P Alcázar et al., 2011). A presença de pólen no ar fora da estação polínica é causada por refluções do pólen depositado na própria planta ou em obstáculos perto da planta (Rede Portuguesa de Aerobiologia, 2015).

Diversos estudos clínicos têm identificado o plátano como uma das principais causas de alergia ao pólen em muitas cidades espanholas. O pólen de plátano é considerado um dos pólenes mais alergizantes em casos de alergia ao pólen. Em Madrid, onde as árvores de plátano se encontram em maior número, a prevalência dos testes cutâneos positivos é de 52-56% (Purificación Alcázar, Galán, Torres, & Domínguez-Vilches, 2015). De acordo com um estudo realizado por Galveias em 2015, na cidade de Évora existem 438 árvores de plátano (Galveias, 2015).

### 1.2.1.3. Azinheira – “*Quercus rotundifolia*”

A azinheira, é uma árvore angiospérmica dicotiledónea ou folhosa. Pertence à ordem das Fagales, família das Fagáceas, género *Quercus*. Originária do sul da Europa, é espontânea em quase toda a bacia do mediterrâneo (citado de [arvoresdeportugal.free.fr](http://arvoresdeportugal.free.fr) <sup>[10]</sup>). É uma árvore de copa geralmente ampla e arredondada, pode alcançar os 25 m de altura, ainda que raramente ultrapasse os 15-20m. Mantém as folhas verdes todo o ano e floresce na primavera, entre os meses de Abril-Maio (citado de [plantarumaarvore.org](http://plantarumaarvore.org) <sup>[11]</sup>).

A azinheira é classificada como *Quercus ilex*, apresentando uma folhagem verde escura e lustrosa e as folhas de ovado-lanceoladas e elípticas ou como *Quercus rotundifolia* que possui uma folhagem acinzentada e baça, folhas pequenas, grossas e arredondadas (Lumaret, Mir, Michaud, & Raynal, 2002). Quanto à denominação “*ilex*” ou “*rotundifolia*” ainda não existe unanimidade, pois para alguns botânicos existe apenas uma espécie de azinheira designada de *Q.ilex*, que teria duas subespécies: *Q.ilex* subsp. *ilex* e *Q.ilex* subsp. *rotundifolia* (citado de [sombra-verde.blogspot.pt](http://sombra-verde.blogspot.pt) <sup>[12]</sup>).

No que diz respeito à sua distribuição geográfica, a azinheira localiza-se em zonas mediterrânicas continentais ou subcontinentais. Em Portugal encontra-se em grande parte do território (ver Figura 13), exceto nos climas temperados do norte e centro litorais( citado de [florestar.net](http://florestar.net)<sup>[13]</sup>). A época de polinização e floração da azinheira ocorre entre Março e Abril e a maturação dos seus frutos no Outono. Na região de Évora, o pico polínico do pólen de azinheira ocorre geralmente no mês de Abril, cerca de um mês antes da época polínica das gramíneas (Caeiro, 2013).

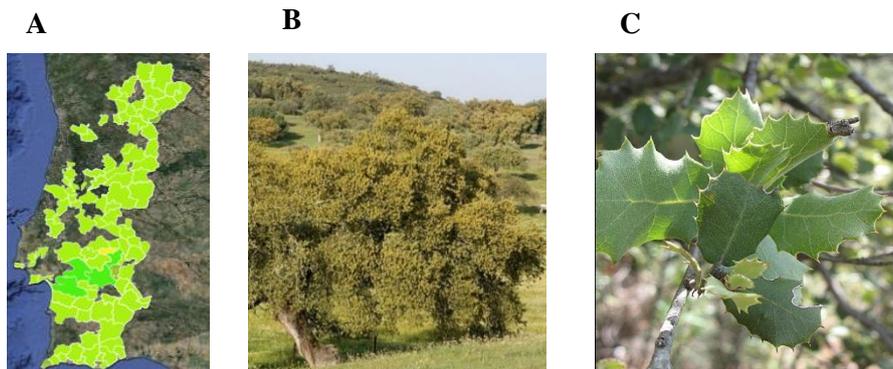


Figura 13 - Distribuição geográfica da azinheira em Portugal (A) (retirado de naturdata.com <sup>[14]</sup>); Imagem representativa da árvore de azinheira (B) (retirado de flora-on.com <sup>[7]</sup>); Imagem representativa da folha de azinheira (retirado de flora-on.com <sup>[7]</sup>).

### 1.2.2. Pólen e os seus alergénios

O grão de pólen é uma estrutura especializada que contém os gâmetas masculinos das plantas com flores e que tem como função biológica fecundar o gametófito feminino. Na natureza, os pólenes possuem vários formatos e tamanhos (Figura 14).

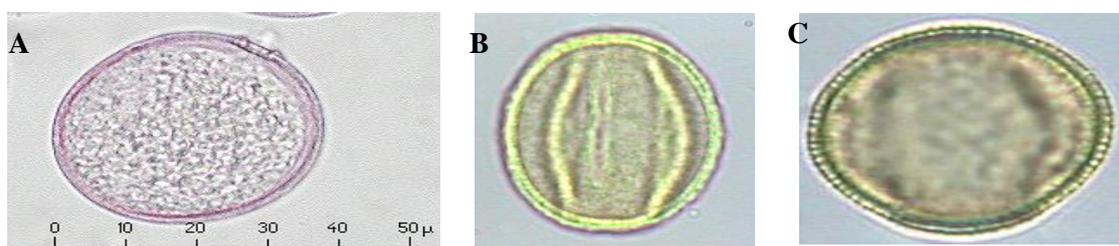


Figura 14 - Grão de pólen de *D. glomerata* (A), *Q. rotundifolia* (B); *P. hispanica* (C) (retirado de pharmallerga.com <sup>[15]</sup> e plantasyhongos.es <sup>[16]</sup>).

O vento e outros agentes transportam o pólen das anteras até ao estigma da mesma flor ou de outra flor da mesma espécie, permitindo assim a reprodução. As plantas polinizadas pelo vento libertam o pólen para a atmosfera durante a época polínica. Estes pólenes tornam-se parte do aerossol atmosférico, existindo em suspensão juntamente com outras partículas (Duque, Guimarães, Ribeiro, Sousa, & Abreu, 2013).

Os alergénios provenientes do pólen são proteínas ou glicoproteínas lipossolúveis que possuem um peso molecular que varia entre os 10 -70 kDa, são frequentemente resistentes a mudanças de pH e a temperaturas elevadas (Puc, 2003).

No que diz respeito à nomenclatura dos alergénios polínicos, esta foi unificada com base em recomendações publicadas pela Organização Mundial de Saúde em 1994, em que as designações derivam das primeiras três letras do género, da primeira letra da espécie e o algarismo que acompanha as letras denota a sequência de identificação e descrição de um determinado alergénio (Puc, 2003).

### 1.2.2.1. Alergénios encontrados nas gramíneas

Os alergénios do pólen de gramíneas são a causa mais comum de alergia e, em todo o mundo, pelo menos 40% dos indivíduos alérgicos encontram-se sensibilizados a pólenes de gramíneas (Puc, 2003; Taketomi et al., 2006a). Estes alergénios demonstram uma intensa reatividade cruzada com outras espécies (Puc, 2003). Muitos dos alergénios de *D. glomerata* já foram caracterizados (Tabela 6). Do ponto de vista clínico, os alergénios do grupo 1 são os mais importantes, sendo reconhecidos aproximadamente por 95% dos pacientes sensibilizados a pólen de gramíneas, seguindo-se os alergénios do grupo 5, reconhecidos por cerca de 85% destes indivíduos. Outros alergénios clinicamente relevantes são os do grupo 2, 3, 4 e 13 que são reconhecidos por mais de 50% dos indivíduos alérgicos ao pólen de gramíneas (Fahlbusch et al., 1998). Um dos fatores a ter em conta é a reatividade cruzada, constatada entre os alergénios presentes no pólen de gramíneas (Alcaraz, 1996).



Figura 15 - Distribuição geográfica de *D. glomerata* em Portugal (retirado de “jardim botânico utad | dactylis glomerata”<sup>[8]</sup>).

Tabela 6 - Características dos diferentes alergénios de *D. glomerata* (retirado de allergome.org<sup>[9]</sup>).

Alergénios	Função Biológica	Massa Molecular (kDa)	pI	Reatividade Cruzada
Dac g 1	Expansina	32 kDa	6	Lol p1
Dac g 2	Desconhecida	10 kDa		
Dac g 3	Desconhecida	14 kDa	9	
Dac g 4	<i>Berberine Bridge Enzymes</i>	60 kDa	10,4	
Dac g 5	Ribonucleases	26 kDa		Lol p5 Phl p5
Dac g 7	Ca <sup>2+</sup> -BP, Polcalcina	9 kDa		
Dac g 12	Profilina	14 kDa		Che a2
Dac g 13	Poligalacturonases	60 kDa		

A Tabela 6 apresenta, além da função biológica dos alergénios mais relevantes de *D. glomerata*, as suas características bioquímicas em termos de massa e ponto isoelétrico (pI). Identifica ainda alguns alergénios de outras espécies de gramíneas que apresentam reatividade cruzada com *D. glomerata*. Esta reatividade cruzada é muito provavelmente explicada por se tratarem da mesma família de proteínas, ou de proteínas com uma grande homologia sequencial/estrutural.

### 1.2.2.2. Alergénios encontrados em plátano

Muitos dos alergénios correspondentes a esta espécie já foram isolados e caracterizados. O primeiro alergénio a ser identificado foi o Pla a 1, é considerado o alergénio “major” e também o principal da espécie *Platanus* (Fernández-González, Guedes, Abreu, & Rodríguez-Rajo, 2013). O nível de sensibilização da população ao pólen de plátano ainda não se encontra claro, no entanto, a bibliografia refere que cerca de 87% dos indivíduos sensibilizados ao pólen de plátano reagem a Pla a 1 e 83% a Pla a 2 (Asturias et al., 2002). As características de cada alergénio encontram-se representadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Características dos diferentes alergénios de *P. hybrida* (retirado de allergome.org <sup>[9]</sup>).

Alergénio	Função Biológica	Massa Molecular	pI
Pla a 1	Inibidor da Invertase	18 kDa	9.3
Pla a 2	CCD-b-P <sup>1</sup>	43 kDa	>9.3
Pla a 3	nsLTP tipo 1	10.5 kDa	>7
Pla a 5	Ribonuclease	35 kDa	
Pla a 8	Profilina	15 kDa	
Pla TLP	TLP <sup>3</sup>	25 Da	

### 1.2.2.3. Alergénios encontrados em *Quercus*

O pólen deste grupo tem sido considerado pouco alergizante e encontra-se provavelmente por essa razão, pouco estudado. Para esta espécie ainda não foram identificados alergénios, no entanto, para outras espécies do género *Quercus*, alguns já foram caracterizados (ver Tabela 8).

Tabela 8 - Características dos diferentes alergénios das espécies do género *Quercus* (retirado de allergome.org<sup>[9]</sup>).

Espécie	Alergénio	Massa Molecular (kDa)	Função Biológica	Reatividade cruzada
Q. alba	Que a 1	17 kDa	Proteínas - PR	Aln g 1 Bet v 1 Car b 1
Q. alba	Que a 2	14 kDa		Aln g 2 Bet v 2 Car b 2
Q. alba	Que a 4	9 kDa	Proteínas ligantes de cálcio	Aln g 4 Bet v 4 Car b 4
Q. rubra	Que ru 1		Proteínas- PR	
Q. suber	Que su 1		Proteínas - PR	
Q. róbúr	Percursor da Legumina	25,8 kDa		
Q. serrata	Legumina	15,1 kDa		
Q. gilva	Legumina	8 kDa		

### 1.3. Metodologias usadas na investigação de novos alergénios

#### 1.3.1. Eletroforese

O termo eletroforese refere-se ao movimento de moléculas com carga em resposta à aplicação de um campo elétrico, resultando na sua separação. É uma técnica muito utilizada para separação de proteínas e de ácidos nucleicos, uma vez que são moléculas ionizáveis ou com carga.

##### 1.3.1.1. SDS-PAGE

A eletroforese em SDS-PAGE é uma das técnicas mais utilizadas para a análise de proteínas (Figura 16). É um tipo de eletroforese que utiliza amostras desnaturadas pelo calor na presença de agentes desnaturantes, como o  $\beta$ -mercaptoetanol ou o di-tiotreitol (DTT), que quebram as pontes dissulfeto presentes rompendo assim possíveis estruturas terciárias, e o SDS, que é um agente aniónico que se liga a radicais hidrófobos das proteínas e que desnatura a proteína, agindo ainda na separação das cadeias polipeptídicas isoladas. O SDS confere carga negativa às proteínas, facilitando a separação por peso molecular, essa mobilidade está relacionada diretamente com o tamanho da proteína.

Outro fator que influencia a mobilidade das proteínas no gel é o tamanho dos poros do mesmo. Concentrações elevadas de acrilamida (13-20%) originam poros pequenos e são

utilizados para resolver moléculas pequenas, enquanto que concentrações baixas de acrilamida (7-12%) são utilizadas para separar proteínas de grandes dimensões. Dessa forma, as proteínas grandes ficam retidas no início da corrida e os pequenos péptidos migram até ao fim do gel.

No fim da eletroforese, o gel pode ser corado com azul de Coomassie ou seguir para imunoblot, para identificação das bandas proteicas. Uma vez separadas e identificadas, a posição das proteínas é definida por comparação à migração de um padrão, que contém proteínas de massa molecular conhecida. Dessa forma, é possível determinar o tamanho molecular de proteínas entre 5 e 250 kDa, dependendo do gel e do padrão utilizado (Bio-Rad, 2007).

A Figura 16 mostra uma representação esquemática de uma eletroforese com separação proteica por SDS-PAGE.

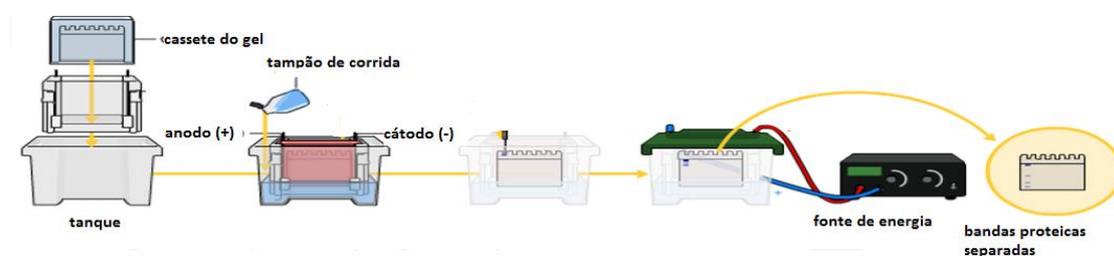


Figura 16 - Representação esquemática de eletroforese por SDS-PAGE (adaptado de [protocolosonline.com](http://protocolosonline.com)<sup>[17]</sup>).

### 1.3.1.2. Focagem isométrica - IEF

A focagem isométrica é um método que permite a separação de proteínas e péptidos de acordo com o seu ponto isoeletrico, ou seja, com base no pH para o qual a proteína tem carga neutra, o que depende dos grupos funcionais de cada uma (Figura 17). O gel utilizado neste tipo de eletroforese tem um poro largo e contém anfólitos, que se dispõem após a aplicação de um campo elétrico, de forma a produzir um gradiente contínuo baseado nas suas cargas totais, estabelecendo assim um gradiente de pH. As proteínas carregadas vão deslocar-se ao longo do gradiente de pH até atingirem o seu pI, ou seja, até atingirem a zona onde a sua carga global é nula, deixando então de migrar. Neste ponto as proteínas dizem-se “focadas” (Amersham, 1998).

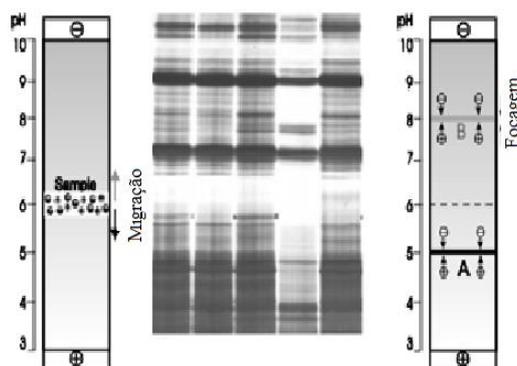


Figura 17 - Representação de uma IEF (Amersham, 1998)

### 1.3.2. Imunoblot

O imunoblot é uma técnica que permite a identificação de proteínas específicas a partir de uma mistura complexa de proteínas. Esta técnica utiliza três elementos: a separação de proteínas (por focagem isoeétrica e/ou SDS-PAGE); a transferência das proteínas para um suporte sólido e marcação das proteínas com um anticorpo primário e secundário (citado de [abdserotec.com](http://abdserotec.com)<sup>[2]</sup>).

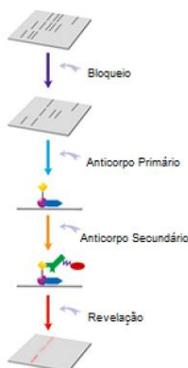


Figura 18 - Esquema ilustrativo dos processo de imunodeteção (adaptado de [genscript.com](http://genscript.com)<sup>[18]</sup>).

As proteínas separadas por eletroforese são transferidas para uma membrana de forma a obter uma réplica do padrão das proteínas no gel. Para a transferência, podem ser utilizados vários métodos: aplicação direta, como é o caso do *dot blot*, transferência ativa (eletrotransferência) ou transferência passiva (por capilaridade). Após a transferência, procede-se ao bloqueio da membrana de forma a saturar os locais de ligação da proteína não ocupados, para evitar ligações não específicas dos anticorpos. A membrana é depois incubada com o anticorpo primário.

Seguidamente é colocada em contacto com um anticorpo secundário que se encontra conjugado com um enzima (fosfatase alcalina ou peroxidase) que vai funcionar como um sinalizador molecular, permitindo a visualização da proteína detetada. Para que o enzima seja detetado é necessária a utilização de um substrato que é geralmente quimiluminescente e quando é combinado com o enzima produz como bioproducto acompanhado de emissão de radiação eletromagnética. Esta radiação vai ser detetada através de uma câmara de imagem apropriada para a deteção de quimiluminescência. A intensidade da radiação obtida está correlacionada com a quantidade de antigénio que se encontra presente na membrana, independentemente do substrato que tenha sido utilizado (citado de [abdserotec.com](http://abdserotec.com)<sup>[2]</sup>).

### 1.3.3. Utilização de linhas celulares

Os métodos imunoquímicos já descritos permitem identificar se um determinado indivíduo possui IgE específica para um determinado alergénio ou extrato de alergénios. Contudo, essa informação não permite, diretamente, prever a possibilidade de ocorrência de reação alérgica do tipo I. O recurso a linhas celulares de mastócitos ou basófilos sensibilizados tem a vantagem de permitir reproduzir a resposta biológica *in vivo*, simulando a resposta do organismo (Vogel et al., 2005).

A linha celular RBL foi desenvolvida em 1973 através da indução de leucemia em ratos alimentados com um carcinogénio químico, a  $\beta$ -cloratinamina. Nesta linha de basófilos, era

possível avaliar a libertação de histamina em resposta a estímulo com alergénios (Eccleston, Leonard, Lowe, & Welford, 1973).

Mais recentemente, foram desenvolvidas, por transfeção dos basófilos com cDNA para o recetor humano de IgE de elevada afinidade, linhas RLB que expressam este recetor (Vogel et al., 2005), e que permitem o estudo da sensibilização a alergénios em soros de pacientes humanos alérgicos. Existem dois clones que normalmente são utilizados, por se ter comprovado a manutenção dos mecanismos de regulação de libertação de histamina, as RBL-2H3 e RBL-h21 (Barsumian, Isersky, Petrino, & Siraganian, 1981). Estas linhas apresentam curva dose-resposta em forma de sino, característica da ativação das células mediadas pelo recetor de IgE de elevada afinidade (Wilson, Pullar, Camp, & Helm, 1993) e têm sido utilizadas na padronização dos extratos de pólen (Kaul et al., 2007).

Para este fim, as células mantidas em cultura são primeiramente incubadas com soros de indivíduos alérgicos, e as moléculas de IgE presentes nestes soros ligam-se na superfície celular (no recetor de IgE de elevada afinidade). A estimulação subsequente com extratos de alergénios induz libertação de histamina, que pode ser quantificada. Assim, é possível estudar a atividade biológica dos extratos, sem recurso direto aos testes de provocação atualmente conduzidos *in vivo* (Vogel et al., 2005).



# *CAPÍTULO 2*

## *Objetivos*



## 2.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como principal objetivo o estudo do perfil alergológico do pólen de *P.hybrida* e *Q.rotundifolia* numa população de Évora com doença alérgica respiratória.

## 2.2. Objetivos específicos

I. Estudo da imunorreatividade a *P.hybrida* e *Q.rotundifolia* na população de Évora. Neste âmbito:

- Averiguou-se a correlação de vendas de medicamentos anti-alérgicos com as curvas polínicas
- Averiguou-se a sensibilização da população recorrendo a testes de EAST e EAST inibido com *D.glomerata*
- Analisou-se o efeito dos extratos sobre a ativação dos basófilos

II. Caracterização do perfil em alérgenos do pólen de *P.hybrida* e *Q.rotundifolia*

- Identificação de alérgenos principais de *P.hybrida* e *Q.rotundifolia*
- Avaliação da reatividade cruzada com *D.glomerata*.



# *CAPÍTULO 3*

## *Problema*



As manifestações alérgicas têm vindo a aumentar durante os últimos anos, constituindo um dos principais problemas de saúde pública em muitos países. Os pólenes constituem a segunda maior causa de alergias respiratórias, não estando ainda bem esclarecido o mecanismo pelo qual são desencadeadas. De acordo com a rede portuguesa de aerobiologia, na região de Évora os pólenes predominantes são os das gramíneas, o de azinheira e o de plátano (Rede Portuguesa de Aerobiologia, 2015). Comparando com as gramíneas, as azinheiras e os plátanos têm sido consideradas espécies polínicas que produzem pólenes menos alergizantes, não sendo conhecida bem a sensibilização da população a pólenes destas espécies.

No entanto, existem registos de sintomas por parte de pacientes alérgicos em Março e Abril (período de polinização de plátano e azinheira) que são anteriores e não se correlacionam com as épocas polínicas das gramíneas e da oliveira que ocorrem geralmente em Maio. Assim, tendo em conta a abundância destas espécies no Alentejo, por um lado, e o facto de apresentarem o seu pico polínico no período de Março a Abril, por outro, podendo eventualmente ser responsáveis pelos sintomas pré-época registados por muitos pacientes alérgicos. Torna-se assim muito relevante conhecer a sensibilização da população alérgica do Alentejo a estes tipos polínicos, bem como procurar esclarecer se esta é especificamente induzida ou se resulta de reatividade cruzada com proteínas de outras espécies

O trabalho a desenvolver propõe um estudo sobre a população local, com vista a avaliar a resposta alergológica de um grupo de alérgicos da região aos tipos polínicos em estudo. Para tal procurar-se-á analisar a sensibilização dos indivíduos a estes tipos polínicos, analisar potencial reatividade cruzada com gramíneas, determinar quais os meses do ano em que há uma maior afluência à compra de medicamentos utilizados no tratamento da doença alérgica respiratória e averiguar a sua correlação com as curvas polínicas, bem como identificar alguns alergénios de *P.hybrida* e *Q.rotundifolia* recorrendo a técnicas de SDS-PAGE e IEF para separação de proteínas e *imunoblot* para identificação de bandas imunorreativas. Recorrer-se-á também ao teste de ativação de basófilos para avaliar o efeito biológico dos extratos em estudo.



# *CAPÍTULO 4*

## *Materiais e métodos*



## 4.1. Estratégia

**Local de realização:** Laboratório de Bioquímica, Fase III do Colégio Luís António Verney, Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora.

**Apoios:** Escola de Ciências e Tecnologia, Instituto de Ciências da Terra, Fundação Para Ciência e Tecnologia (FCT), COMPETE 2020, Farmácia Gusmão, Farmácia Galeno, Farmácia Ferro, Farmácia Avó, Farmácia da Misericórdia, Farmácia Motta, Farmácia Central, Farmácia Diana, Hospital Espírito Santo de Évora (HESE), Centro de Estudos e Avaliação em saúde (CEFAR).

**Duração:** 1 ano letivo

### Amostras:

- Soros de indivíduos alérgicos;
- Extrato aquoso de *D. glomerata*;
- Extrato aquoso de *P. hybrida*;
- Extrato aquoso de *Q. rotundifolia*;

### Técnicas utilizadas:

- Extração aquosa;
- Centrifugação;
- Liofilização;
- EAST;
- Eletroforese de Focagem Isoelétrica (IEF);
- Eletroforese em SDS-PAGE;
- *Imunoblotting*;
- Cultura celular;

## 4.2. Procedimento experimental

### 4.2.1. Indicadores indiretos de sintomas

Para o estudo de indicadores indiretos de sintomas foram utilizados dados sobre venda de medicamentos utilizados no tratamento da doença alérgica respiratória, nomeadamente anti-histamínicos, anti-inflamatórios e broncodilatadores. Estes dados foram fornecidos pelo Centro de Estudos e Avaliação em Saúde (CEFAR) e foram tratados de forma estatística utilizando o programa Microsoft Excel.

#### **4.2.2. Dados de índice polínico**

Os dados respetivos aos índices polínicos foram obtidos através da reanálise dos dados descritos em Caeiro, 2013, relativamente à contagem de grãos de pólen para plátano, *Quercus*, poaceas e oliveira.

#### **4.2.3. Obtenção dos soros de indivíduos alérgicos**

O Projeto foi submetido a avaliação pela Comissão de Ética da Universidade de Évora, tendo obtido aprovação (GD/44721/2015/P1).

Neste trabalho foram utilizados 9 soros oriundos de doentes com alergia respiratória que frequentavam as consultas de imunoalergologia do Hospital Espírito Santo de Évora (HESE) que apresentavam polinose. Foi obtido consentimento informado e garantido o anonimado dos doentes, atribuindo a cada amostra serológica um código interno: S1, S2, S3 S5, S7, S8, S9, S10, S12. Dos 9 soros testados, 2 pertenciam ao género masculino e 7 ao género feminino.

#### **4.2.4. Preparação dos extratos proteicos de *P.hybrida*, *Q.rotundifolia* e *D.glomerata***

Os pólenes de *P.hybrida* e *Q.rotundifolia* foram colhidos no pólo da Mitra da Universidade de Évora, durante a sua época polínica. O pólen de *D.glomerata* foi comprado na Allergon AB.

Para a obtenção dos extratos proteicos, começou-se primeiramente por se pesar 0,1g de pólen de cada espécie para um tubo de falcon de 15 mL e adicionou-se 10 mL de tampão de extração de bicarbonato de amónio. As amostras foram colocadas num agitador, onde foram agitadas por inversão na ausência de luz durante 2 horas. De seguida realizou-se uma centrifugação de 10 min a 1500 g. O sobrenadante foi recolhido para novos tubos de falcon devidamente identificados. De seguida foram adicionados mais 5 mL de tampão de extração de bicarbonato e voltou-se a incubar nas condições descritas anteriormente. Quando a incubação terminou, as amostras foram novamente centrifugadas durante 10 min a 1500 g e de seguida, os sobrenadantes foram recolhidos e adicionados aos anteriores.

Posteriormente, foram feitas alíquotas de 5 mL que foram submetidas a uma temperatura de -80°C, seguida de liofilização, processo que tem por objetivo a remoção da solução tampão por sublimação. Após a liofilização adicionaram-se 500 µL de água bidestilada aos extratos de *P.hybrida* e *D.glomerata* e 1 mL de água bidestilada ao extrato de *Q.rotundifolia*. Os extratos foram depois colocados em gelo a hidratar e após dissolução das proteínas, as amostras foram

centrifugadas a 1500 g durante 10 min de forma a remover detritos não solúveis. Por fim, fizeram-se várias alíquotas do extrato, que foram armazenadas a -20°C.

#### 4.2.2.1. Quantificação de proteínas

A quantificação do teor proteico das amostras foi efetuada utilizando o método de Bradford. Este método baseia-se na ligação das proteínas a um corante, o Coomassie Blue G-250. Quando este corante se encontra em solução ácida existe em duas formas, uma azul e outra laranja. As proteínas vão unir-se à forma azul para formar um complexo proteína- corante com um coeficiente de extinção maior do que o corante livre (Figura 19) (Fernández & Galván, 2006).

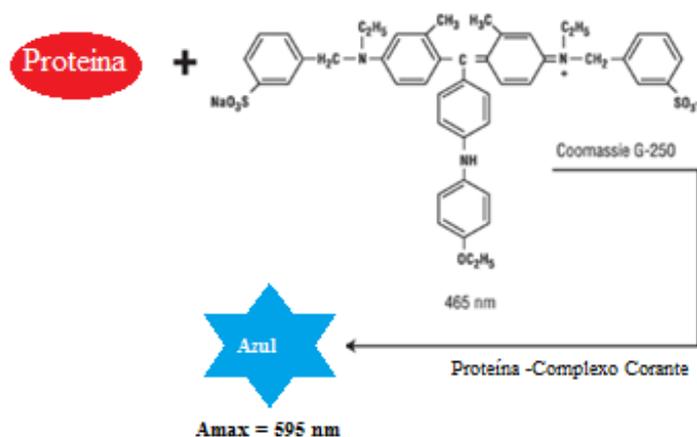


Figura 19 - Esquema da reação que ocorre no método de Bradford (adaptado de qcbio.com <sup>[20]</sup>).

Realizaram-se 3 diluições das amostras (5X, 10X, 20X). De seguida preparou-se a curva de calibração em que se utilizou a solução de BSA (sigma-aldrich) como padrão, com concentrações a variar entre os 0 e 200 µg/mL. De seguida foram aplicados 10 µL de cada padrão e de cada amostra diluída, em triplicado, numa placa de 96 poços. Posteriormente a cada uma destas soluções adicionaram-se 200 µL de reagente de Bradford (dissolver 0,020g de azul Coomassie G-250 em 12,5 mL de etanol 95%, adicionar 25 mL de ácido fosfórico e perfazer com 200 mL de água) e aguardou-se 5 min à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, leu-se a absvância a 630 nm no leitor de microplacas.

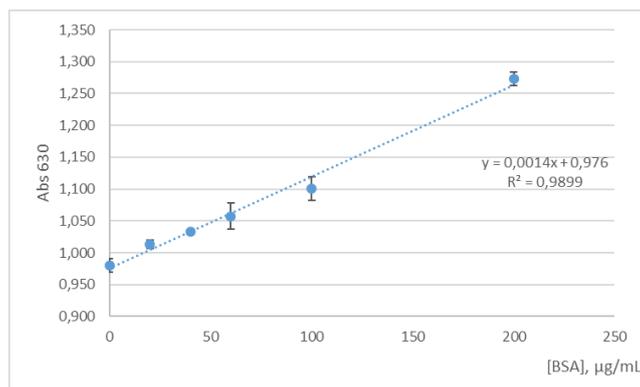


Figura 20 - Curva de calibração obtida pelo método de Bradford. Os pontos apresentados são correspondentes a triplicados.

### 4.2.3. Enzyme Allergo Sorbent Test -EAST

Previamente, fizeram-se discos de nitrocelulose com 5 mm de diâmetro e 20 mm<sup>2</sup> de área. Após a colocação de 1 disco por poço, numa placa de 96 poços (Figura 21), aplicaram-se 10 µL de extrato, tamponado com TBS-T de forma a obter uma quantidade de 10µg no caso de *P. hybrida* e 20 µg no caso de *Q. rotundifolia*. As placas foram depois colocadas no frigorífico *overnight*.

No dia seguinte, procedeu-se ao bloqueio com BSA a 0,1 % aplicando-se 100 µL por poço, tendo este ocorrido durante 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação. Decorrido esse tempo, procedeu-se a uma lavagem de 10 min, aplicando-se 100 µL de TBS-T a cada poço, com a placa sob agitação. Após as lavagens, realizou-se a incubação das membranas com os soros que foram preparados em TBS-T, com uma diluição de 1:50 e a cada poço foram adicionados 50 µL. Esta incubação decorreu durante 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação.

Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas cinco vezes durante cinco minutos com TBS-T e incubadas com 50 µL de anticorpo secundário, anti-IgE humana (anticorpo fornecido por Sigma Aldrich), preparado em TBS-T (1:6000). A incubação ocorreu durante duas horas, sob agitação.

Após a incubação foram realizadas cinco lavagens de cinco minutos com TBS-T. Antes da revelação as membranas foram deixadas a secar. Para a revelação das membranas utilizou-se o substrato ECF Western Blotting (GE Healthcare). O produto da reação é fluorescente, podendo a fluorescência ser registada por captação de imagem no sistema Gel-Doc system e *software* da Bio-Rad.

Em paralelo prepararam-se soros inibidos com extrato de *D. glomerata*, com vista à determinação de reatividade cruzada. Para isso, adicionaram-se 20 µL de extrato a uma tira de membrana de nitrocelulose e deixou-se a membrana secar. Após a secagem da membrana,

realizou-se o bloqueio com 0,1% BSA e posteriormente colocou-se a membrana dentro dos diferentes soros, diluídos de 1:50, durante cerca de 1 hora. Decorrido o tempo de incubação, a porção de membrana foi descartada e procedeu-se à avaliação da imunorreatividade dos soros de acordo com o procedimento experimental referido acima.

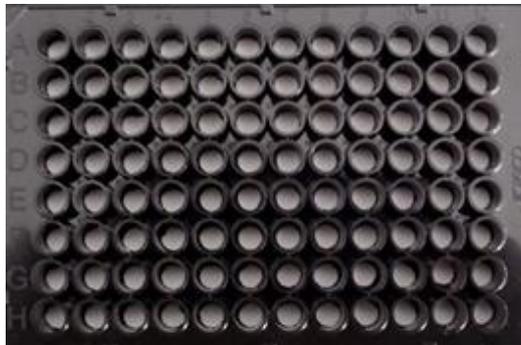


Figura 21 - Exemplo da microplaca utilizada para o imunoblot em substrato sólido.

#### **4.2.4. Separação de proteínas**

##### **4.2.4.1. Focagem isoeétrica (IEF)**

Primeiramente foi preparado o gel. Para a preparação do gel, removeu-se o papel que protege a película de suporte ao gel de poliacrilamida e pipetou-se uma gota de água para identificar a face hidrofóbica da película. Colocaram-se então algumas gotas de água nessa face para promover a adesão da película ao vidro. Colocou-se o vidro com a respetiva película na placa de polimerização do gel, tendo em atenção que a face contendo a película deve ficar virada para a placa. Seguidamente preparou-se uma solução de acordo com as indicações que são fornecidas na Tabela 9, colocando-se todos os componentes pela ordem que se encontram na tabela, num tubo de 15 mL de modo rápido de forma a evitar o início da polimerização no tubo. A solução final foi pipetada para o espaço entre a placa e a película de suporte do gel e colocada debaixo de uma luz fotopolimerizadora (radiação UV) de forma a incidir sobre o gel. Aguardou-se cerca de 1h 15min – 1h 30min até que a polimerização estivesse concluída. O suporte contendo o gel foi virado ao contrário deixando a luz UV a incidir sobre o gel durante mais 15 min.

Tabela 9 - Mistura necessária para obtenção do gel de IEF.

Gel de de IEF
2,75 mL de água destilada
1,5 mL de concentrado de monómeros
1 mL de glicerol
0,25 mL de anfólitos
50 $\mu$ L de FMN
5 $\mu$ L de TEMED
15 $\mu$ L de persulfato de amónio

Com o auxílio de um aplicador colocaram-se as amostras e o padrão (GE Helthcare, pH 3-10) no gel, tendo em atenção que a quantidade de amostra colocada era de 10  $\mu$ g e o volume de padrão era 1  $\mu$ L. As amostras foram colocadas em banda continua. Depois de aplicadas, aguardaram-se 5 minutos, para que amostras penetrassem bem no gel. Posteriormente, os elétrodos de grafite foram humedecidos e o gel foi colocado em contacto com estes. Ligou-se a fonte de alimentação com uma voltagem contante, primeiramente a 100 V durante 15 min, de seguida a 200 V durante 15 min e por fim a 450 V durante 1 hora.

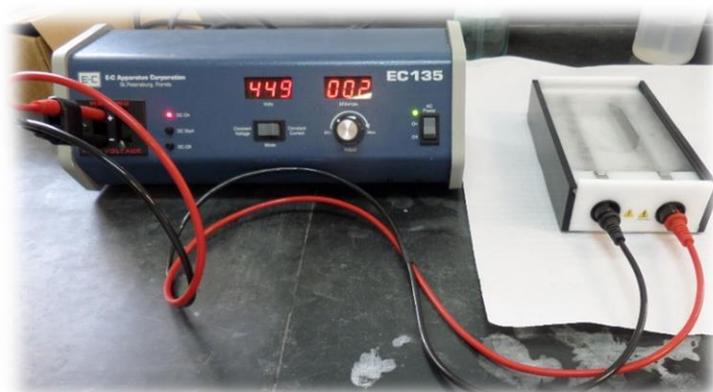


Figura 22 - Equipamento utilizado para a corrida eletroforética IEF.

Terminada a corrida eletroforética, a parte que tinha o padrão e uma poção da amostra foi cortada para coloração com solução azul de Comassie para revelação das bandas proteicas. Na restante parte do gel realizou-se a transferência por capilaridade (ver secção 4.2.5). Para corar o gel, este foi submerso numa solução fixadora (30% metanol, 5% TCA, 3,5% ácido sulfossilicílico) durante 1h, seguida de uma solução corante (0,2% Azul Comassie R-250, 28% etanol, 14% ácido acético). De seguida o gel foi submerso numa solução descorante I (0,5% sulfato de cobre II, 28% etanol, 14% ácido acético glacial) durante *overnight*. Por fim, o gel deverá ser transferido para uma solução descorante II (25% etanol, 7% ácido acético) até se obter uma boa definição das bandas. Após descorar, o gel deve ser colocado à temperatura ambiente, ao ar livre, até secar completamente.

Após a secagem do gel, identificaram-se as bandas do padrão, que irão permitir o cálculo do pI das amostras, com base nas bandas do padrão, cujo pI é conhecido.

#### 4.2.4.2. Eletroforese SDS-PAGE

O gel de resolução utilizado continha acrilamida a 7,5% e uma espessura de 0,75 mm. O gel foi preparado tendo sido adicionados todos os componentes pela ordem que se encontra na Tabela 10. Após homogeneização a solução foi colocada no sistema com o auxílio de uma pipeta até cerca de 1 cm abaixo dos pentes, adicionando-se posteriormente água destilada de forma exercer pressão sobre o gel para evitar a formação de irregularidades na superfície do gel. Deixou-se polimerizar durante cerca de 30 a 45 min. A seguir, o sistema foi invertido para retirar a água destilada e com o auxílio de uma pipeta adicionou-se o gel de concentração a 4% de acrilamida (Tabela 10). Colocou-se a solução até ao topo do vidro e por fim os pentes, deixando polimerizar durante 30 a 45 min. Após a polimerização, o pente foi retirado e a câmara interna do sistema de SDS foi montada e preenchida com tampão de corrida de modo a que os poços fossem preenchidos com solução tampão.

Tabela 10 – Mistura necessária para obtenção do gel de resolução e de concentração da SDS-PAGE.

Gel de resolução (7,5%)	Gel de concentração (4%)
3,1 mL água	3,05 mL água
2,5 mL Tris HCl (1,5M) pH 8,8	1,25 mL Tris HCl (0,5M) pH 6,8
100 µL SDS	50µL SDS 10%
4,3 mL Bis/acrilamida (30%)	650 µL Bis/acrilamida (30%)
75µL APS (10%)	75 µL APS
10µL TEMED	5µL TEMED

Para a preparação das amostras foram adicionados a um microtubo 10 µg de amostra (*P. hibryda* e 20 µg de *Q. rotundifolia* e de 3 µL de tampão da amostra 6X. As amostras foram aplicadas em contínuo. As amostras foram aquecidas a 95 °C durante 5 minutos, para que as proteínas presentes na amostra fossem desnaturadas. Após desnaturação, as amostras foram centrifugadas durante alguns segundos para remover eventuais precipitados.

As amostras e o padrão de pesos moleculares (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color) foram pipetados para os respetivos poços, (o volume de amostra pipetada em cada poço era 20 µL e o volume de padrão de 5 µL).

Preencheu-se também a câmara externa com tampão de corrida. Fechou-se o sistema e colocou-se a eletroforese a correr, a uma voltagem constante 140V (60mA, 15 Watt). Quando a

frente da corrida atingiu o fim do gel, a corrente foi desligada a corrida durou cerca de 45min a 1h.

#### **4.2.5. Transferência por capilaridade dos géis de IEF**

A parte do gel que continha as amostras foi transferida para uma membrana de PVDF, por capilaridade. A membrana de PVDF e os papéis de filtro foram previamente cortados nas dimensões adequadas e a membrana foi colocada num banho de metanol de forma a ser ativada, tendo sido depois passada por água destilada. Para a realização da transferência, colocou-se a película que continha o gel na bancada, com o gel voltado para cima, cobriu-se o gel com uma membrana de PVDF, previamente ativada e impregnada com TBS-T, de forma a evitar a formação de bolhas entre o gel e a membrana. Sobre a membrana foram colocadas três folhas de papel de filtro e seis folhas de papel absorvente. O conjunto foi coberto com uma placa de vidro ( $\approx 200$  g). A membrana seguiu para imunodeteção.

#### **4.2.6. Eletrotransferência dos géis de SDS-PAGE**

Terminada a corrida eletroforética, realizou-se a transferência do conteúdo do gel para uma membrana de PVDF, através de uma eletrotransferência. A membrana de PVDF e o papel de filtro foram cortados nas dimensões adequadas para a sua utilização. A membrana foi então ativada por colocação num banho de metanol durante alguns segundos, seguindo-se um banho de alguns segundos em tampão de transferência.

Retirou-se o gel do sistema de eletroforese SDS-PAGE, cortando com o auxílio de uma espátula, a frente de corrida e o gel de concentração. O gel foi colocado no banho de tampão de transferência, juntamente com a membrana. Toda a fase de preparação da *sandwich* foi realizada com a cassette imersa num recipiente que continha tampão de transferência de modo a evitar que as esponjas, os filtros e a membrana secassem. A face preta da cassette ficou voltada para cima, tendo sido colocada a esponja, a folha de papel de filtro, a membrana de PVDF humedecida, o gel equilibrado, a folha de papel de filtro e por fim novamente a esponja. De seguida, a *sandwich* foi fechada, com todo o cuidado, para evitar a formação de bolhas de ar e para que os materiais presentes na *sandwich* não se deslocassem.

A cassette foi colocada no recipiente de eletrotransferência juntamente com uma unidade de arrefecimento e o agitador magnético, para que a distribuição iónica e a temperatura do tampão de transferência se mantivessem constantes, sendo a rotação o mais rápida possível. A tampa foi colocada e os cabos foram ligados à fonte de alimentação, iniciando-se a

transferência, com uma amperagem constante (350mA;150V;40W). A transferência ocorreu durante 1h.

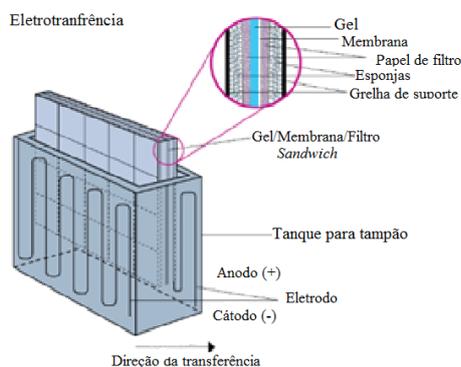


Figura 23 -Esquema de montagem de uma eletrotransferência de proteínas de um gel para uma membrana (adaptado de West, 2004).

Após a transferência a membrana foi removida e colocada numa solução de Ponceau durante 15 min, sob agitação. Posteriormente, a membrana foi colocada em água destilada para remover o excesso de Ponceau. Este processo foi repetido mais três vezes, até se verificar o aparecimento das bandas na membrana e o resultado foi registrado e analisado. Finalmente a membrana foi lavada com água destilada, de forma remover o restante Ponceau, e seguiu para imunodeteção.

#### 4.2.7. Imunodeteção

Por fim, procedeu-se à imunodeteção das membranas contendo as proteínas separadas por SDS-PAGE e por IEF. Primeiramente as membranas foram bloqueadas com TBS-T suplementado com 5% (w/v) leite magro em pó (5g de leite para 100mL de TBS-T), 2h à temperatura ambiente, de modo a bloquear as ligações não específicas presentes na membrana.

De seguida as membranas foram cortadas em várias tiras de aproximadamente 5 mm de largura. Cada tira foi incubada com soros (diluídos de 1:50) *overnight* a 4°C, com agitação.

Depois da incubação com os soros, as membranas foram lavadas quatro vezes durante dez minutos com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário (Sigma A3076 Monoclonal Anti-IgE Humana – fosfatase alcalina), preparado em TBS-T (1:6000), durante 2h à temperatura ambiente. Por fim, realizaram-se quatro lavagens de dez minutos.

Para a revelação das membranas, adicionaram-se pequenas gotas de ECF, substrato da fosfatase alcalina (fornecido por GE HealthCare), sobre uma placa de petri. As membranas foram secas de forma cuidadosa em papel de filtro e colocadas durante cerca de 30 segundos no

substrato. Após a incubação, as membranas foram novamente secas de forma cuidadosa em papel de filtro e as bandas foram reveladas.

#### **4.3. Ensaio biológico com a linha celular RBL-H21 – Liberação de $\beta$ – Hexosaminidase**

Neste trabalho foi realizado o teste de ativação de basófilos, utilizando a linha celular RBL-h21, para avaliar o efeito biológico dos extratos. O ensaio permite identificar a resposta das células marcadas com as IgE dos indivíduos alérgicos (Wilson et al., 1993). Para a realização do ensaio biológico foi utilizada a linha celular RBL-h21, células de basófilos de rato leucêmico que possuem recetor de IgE humano.

Estas células crescem aderentes ao frasco de cultura e foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich), complementado com 10% de *Fetal Bovine Serum* (FBS) e 1% de antibiótico (10,000 unidades de penicilina e 10 mg/mL de streptomicina). As células foram mantidas em crescimento, realizando-se duas passagens por semana até perfazer um mínimo de 6 passagens. Neste processo, o meio de cultura foi aspirado e adicionou-se 2 mL de versénio, para que as células desaderissem do fundo do frasco. O frasco de cultura foi colocado durante 5 min na estufa, que se encontrava a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Decorrida a incubação, o conteúdo do frasco de cultura foi transferido para um tubo de falcon de 15mL, que foi colocado na centrífuga 5 min a 500g, de forma a obter um sedimento celular.

Para a realização do ensaio biológico, as células foram semeadas num frasco de culturas (T75) com 5X10<sup>5</sup> células/frasco, procedendo-se à colheita das células de acordo com o processo descrito anteriormente. A contagem das células viáveis foi feita na câmara de Neubauer, na presença de azul de tripano. Mantiveram-se as células cinco dias, a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. No sexto dia, as células foram observadas ao microscópio e o meio de cultura foi mudado, esperando-se que estas estejam 80-90% confluentes. No sétimo dia, após sementeira, as células foram colhidas e plaqueadas em placas de 96 poços, específicas para células aderentes. Para realizar este passo, as células foram removidas do frasco, através do processo referido anteriormente. As células foram contadas e ressuspendidas num volume necessário de forma obter 1,5 x 10<sup>6</sup> células/mL. Adicionou-se 50  $\mu$ L da suspensão, por poço, na microplaca. De seguida adicionaram-se 50  $\mu$ L das pools de soros (diluídos de 1:10 em meio de cultura DMEM, suplementado com 1% de pen-strep e 10% de FBS).

No dia seguinte as células foram observadas ao microscópio, retirou-se o meio de cultura às células e lavaram-se três vezes com solução tampão Tyrodes. Seguidamente foram preparadas as diluições de anti-IgE e dos extratos. Tanto a anti-IgE como os extratos foram

preparados em tampão de diluição Tyrodes 1X (com 50% de D2O) e adicionaram-se 120 µL por poço de cada diluição. Incubou-se durante 1h na estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>.

Após uma hora de incubação, numa nova placa de 96 poços, adicionou-se 30 µL de solução p-nag e 50 µL do sobrenadante obtido da estimulação das células e incubou-se durante 1 hora na estufa a 37°C. Por fim, parou-se a reação adicionando 100 µL de solução de glicina (0,2 mol/L glicina em água bi-distilada, pH 10,7) e leu-se a placa a um comprimento de onda de 405 nm, num leitor de microplacas.

No ensaio são utilizados três controlos diferentes, em células marcadas e não marcadas com IgE:

- Controlo positivo (Conteúdo total) – adiciona-se 1% de Triton X em PBS de modo a provocar a lise das células. Permite saber qual o conteúdo total em β- hexoaminidase presente nas células
- Controlo negativo (Libertação espontânea) – adiciona-se tampão Tyrodes. Permite saber qual a libertação das células quando não é aplicada qualquer estimulação.
- Controlo positivo (Anti-IgE) – permite conhecer a libertação das células sem que haja estímulo com qualquer alergénio.

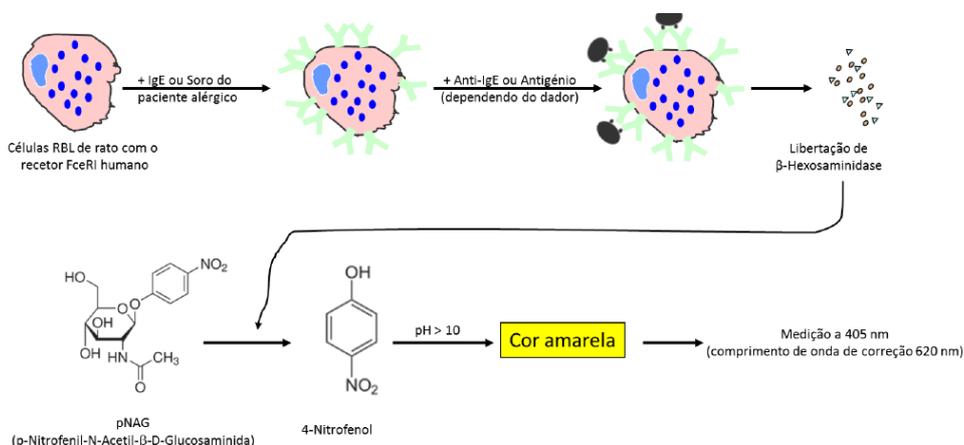


Figura 24 - Representação esquemática do imunoenensaio com cultura celular RBL (adaptado do protocolo fornecido por Zaum).

A libertação β-hexosaminidase foi determinada tendo em conta a atividade espontânea e os controlos adequados a cada caso. Os resultados foram expressos em % do total.

#### 4.4. Análise estatística

Os gráficos apresentados na secção 5 de Resultados e Discussão foram obtidos através do programa Microsoft Excel.

Foram realizadas análises de correlações de *Pearson* através do programa *SPSS*. Os gráficos obtidos na secção 5.1 de Materiais e Métodos correspondentes às correlações foram construídos no programa *Origin*.

As bandas de imunodeteção por *Immunoblot* foram reveladas com o equipamento BioRad Gel-DOC e analisadas com o software *Quantity One*.

# *CAPÍTULO 5*

## *Resultados e discussão*



## 5.1. Caracterização da venda de fármacos anti-alérgicos

### 5.1.1. Estudo de indicadores de sintomas da população alérgica do Alentejo

È objetivo deste capítulo averiguar se a venda de medicamentos utilizados no tratamento das alergias pode ser correlacionado com a época polínica das plantas mais alergizantes. Os dados apresentados na Tabela 11 dizem respeito à região de Évora e foram gentilmente cedidos pelo Centro de Estudos e Avaliação em Saúde (CEFAR).

As informações fornecidas encontram-se divididas em dois grupos distintos: o grupo 1 diz respeito aos medicamentos prescritos durante todo o ano, enquanto que o grupo 2 diz respeito aos medicamentos utilizados em caso SOS.

Tabela 11- Medicamento prescritos para o tratamento da doença alérgica respiratória. Grupo 1 – medicamentos prescritos ao longo do ano; grupo 2 – medicamentos prescritos em caso de SOS.

Grupo 1	Grupo 2
Bilastina	Montelucaste
Cetirizina	Formoterol
Cetotifeno	Salbutamol
Desloratadina	Budesonida
Ebastina	Budesonida + Formoterol
Fexofenadina	Fluticasona
Hidroxizina	Fuorato de fluticasona
Levocetirizina	Mometasona
Rupatadina	

Os medicamentos do grupo 1 encontram-se inseridos no grupo de medicamentos anti-histamínicos (fármacos antagonistas dos recetores de histamina que atuam bloqueando a ligação aos seus recetores ou por inibição da atividade enzimática da histidina descarboxilase, enzima responsável pela transformação da histidina em histamina). Quanto aos medicamentos que se encontram no grupo 2, o Montelucaste é um antagonista dos recetores dos leucotrienos (atua inibindo a síntese dos leucotrienos, responsáveis pelo estreitamento das vias aéreas inferiores e aumento da produção de muco; o Formoterol e o Salbutamol são agonistas beta adrenérgicos (provocam o relaxamento do músculo liso, o que leva à dilatação dos brônquios); a Budesonida é um glucocorticóide utilizado para reduzir as inflamações das vias respiratórias; a Budesonida+Formoterol são uma associação de corticosteróide com um agonista dos adrenorecetores beta<sub>2</sub>; a Fluticasona, Fuorato de fluticasona e a Mometasona pertencem ao grupo dos corticosteróides (Infarmed, 2016).

O gráfico apresentado na Figura 25 mostra o número de embalagens vendidas para os grupos 1 e 2 (traço a azul e laranja, respetivamente), bem como o somatório do número de embalagens dos dois grupos de medicamentos ao longo dos diferentes meses do ano (cinzento).

É possível observar que o grupo 1 é aquele que apresenta um maior número de vendas em qualquer altura do ano. É de notar que no mês de Março a venda de medicamentos foi superior ao registado em Fevereiro (9 549 e 8 165 unidades, respetivamente), mantendo-se em Abril. O pico de vendas toma um valor máximo no mês de Maio, com 14 170 embalagens vendidas, registando-se em Junho e Julho um decréscimo para valores semelhantes a Fevereiro, atingindo-se o valor mínimo em Agosto. Nos meses de Setembro e Outubro observa-se um ligeiro aumento que se mantém sensivelmente constante nos meses de Inverno.

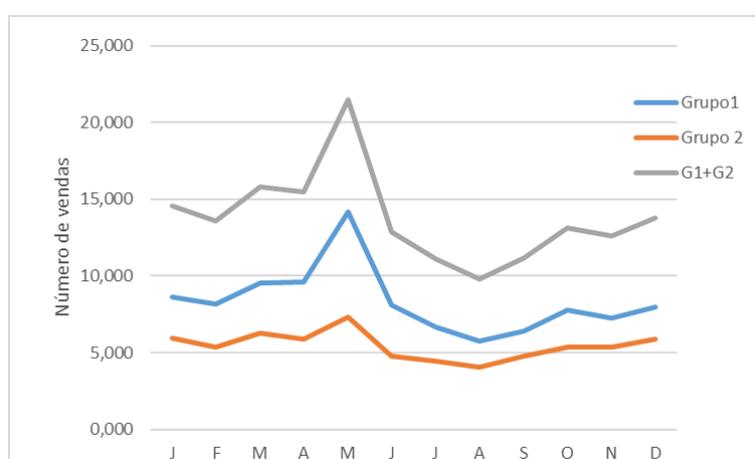


Figura 25 - Média do número de embalagens vendidas durante cada mês entre os anos 2010 e 2015, para os grupos 1 e 2. G1+G2 diz respeito ao somatório do número de embalagens dos dois grupos.

O perfil do grupo 2 é semelhante ao grupo 1, no entanto o pico de vendas é menos intenso, com 7 823 unidades vendidas. É com o somatório do número de medicamentos vendidos que se observam maiores variações no número de unidades.

Na Tabela 12 encontra-se representado o índice mensal de grãos de pólen/m<sup>3</sup> para os tipos polínicos em estudo, considerando um período de seis anos (estes dados foram obtidos através da reanálise das curvas polínicas apresentadas em Caeiro, 2013). É visível que para plátano a polinização ocorre maioritariamente em Março e Abril (Figura 26). Relativamente a *Quercus*, este apresenta libertação de pólen no mês de Abril, com 2400 grãos de pólen/m<sup>3</sup>. No que diz respeito a poáceas, a libertação de pólen ocorre maioritariamente em Maio e Junho enquanto a oliveira se verifica um pico no mês de Maio (Figura 26 e Tabela 12). Quando é feito o somatório dos grãos de pólen para estes tipos observam-se contagens polínicas elevadas

durante os meses de Março a Junho, registando-se um pico em Maio e seguindo-se o mês de Abril.

Tabela 12 - Valores médios mensais de grãos de pólen para plátano, *Quercus*, poáceas e oliveira e somatório dos grãos de pólen libertados por estas espécies. Os resultados foram retirados de Caeiro, 2013.

	Plátano	<i>Quercus</i>	Poáceas	Oliveira	Somatório dos pólenes
Janeiro	0	0	0	0	0
Fevereiro	0	0	0	0	0
Março	1860	180	133	0	2173
Abril	180	2400	167	217	2963
Maio	0	1420	1967	1317	4703
Junho	0	280	1633	150	2063
Julho	0	0	233	17	250
Agosto	0	0	0	0	0
Setembro	0	0	0	0	0
Outubro	0	0	0	0	0
Novembro	0	0	0	0	0
Dezembro	0	0	0	0	0

Na Figura 26 encontra-se apresentado o número de grãos de pólen registados ao longo dos diferentes meses do ano. É visível que começa a haver um aumento no número de grãos de pólen logo no segundo mês do ano, correspondendo este aumento ao plátano. O pico de polinização do plátano ocorre habitualmente no mês de Março, procedendo, o pico de polinização do género *Quercus*, que se dá no mês de Abril. As poáceas e oliveira iniciam a época de polinização em Abril e o valor máximo do índice polínico é atingido em Maio para ambos os tipos polínicos. A polinização das poáceas prolonga-se até Julho ( Figura 26 e Tabela 12).

Efetuando a soma dos índices polínicos mensais para os quatro tipos polínicos descritos, (Figura 26, linha azul a tracejado) observa-se que a época polínica se desenrola desde o mês de Fevereiro até Julho. O índice polínico máximo atingiu-se no mês de Maio, para o qual contribuem maioritariamente os pólenes de *Quercus*, poáceas e oliveira.

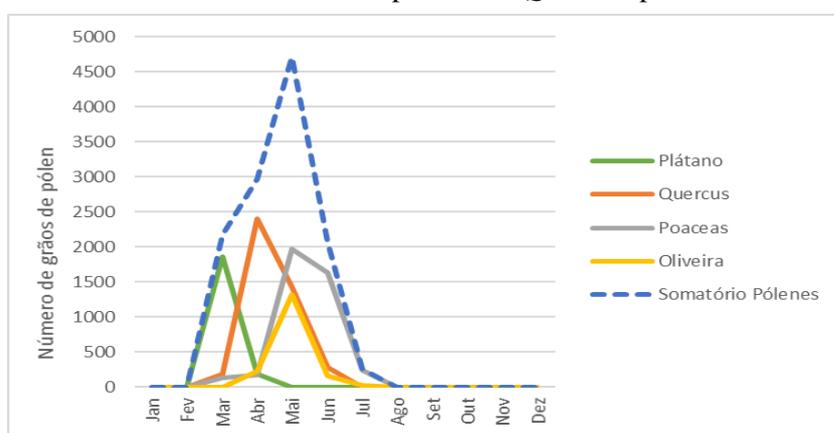


Figura 26 - Número de grãos de pólen registados ao longo dos diferentes meses do ano.

Tendo em conta os resultados correspondentes ao número de embalagens vendidas relativas aos medicamentos utilizados no tratamento da doença alérgica respiratória para dois grupos de medicamentos diferentes e a contagem de grãos de pólen registada ao longo dos diferentes meses do ano, foi-se averiguar a existência de correlação entre o número de embalagens vendidas e os índices polínicos.

Na Figura 27 encontra-se apresentada a correlação entre as vendas de embalagens para os grupos 1 e 2, bem como para o somatório, em relação aos índices polínicos para cada espécie, e ao índice polínico total. É notório que, o aumento dos índices polínicos, é acompanhado pelo aumento do número de unidades vendidas, sendo isto visível para todos os valores apresentados.

Na Figura 27 observa-se ainda que, quando o índice polínico aumenta, o número de unidades vendidas também aumenta, sugerindo uma correlação entre o número de vendas e a contagem de grãos de pólen. No entanto, é para oliveira que parece existir uma melhor correlação. Quando se considera o somatório da contagem de grãos de pólen para as espécies apresentadas esta correlação torna-se mais evidente.

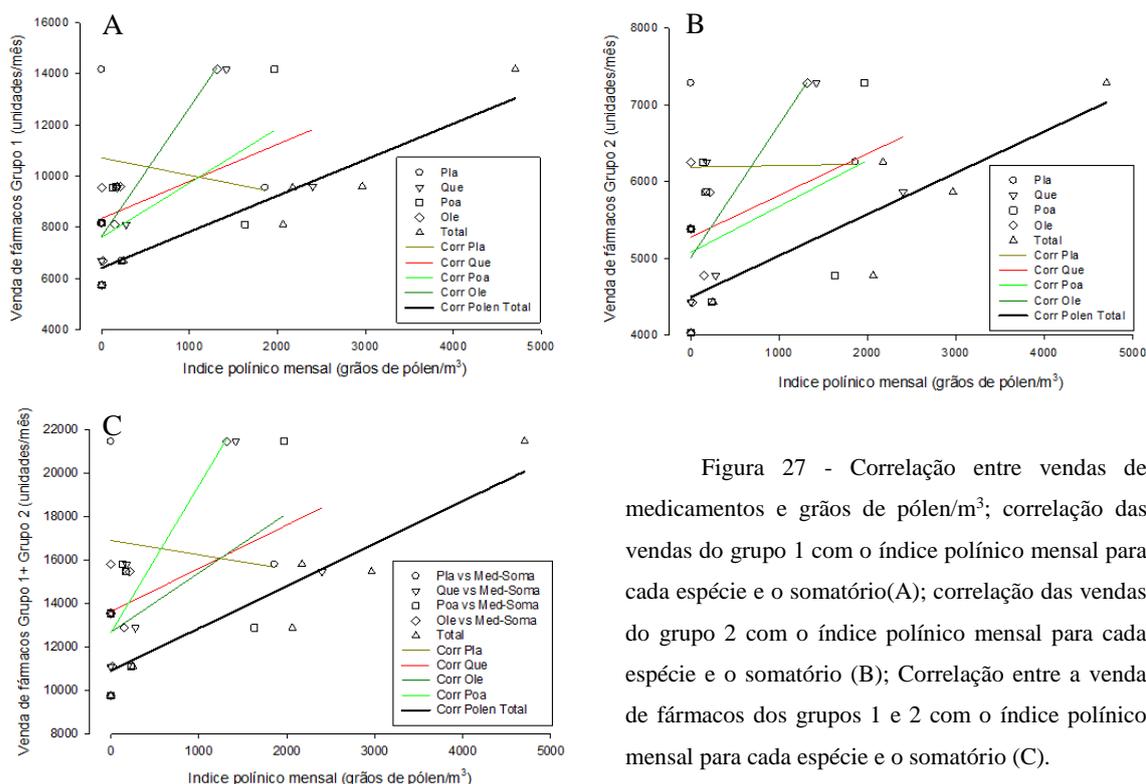


Figura 27 - Correlação entre vendas de medicamentos e grãos de pólen/m<sup>3</sup>; correlação das vendas do grupo 1 com o índice polínico mensal para cada espécie e o somatório(A); correlação das vendas do grupo 2 com o índice polínico mensal para cada espécie e o somatório (B); Correlação entre a venda de fármacos dos grupos 1 e 2 com o índice polínico mensal para cada espécie e o somatório (C).

Os resultados da análise da correlação de correlação de *Pearson*, para todas as espécies em estudo com os grupos 1 e 2 e somatório de ambos os grupos bem como o somatório de todas as espécies com o somatório do número de embalagens vendidas para os dois grupos encontram-se na Tabela 13.

Para o plátano obteve-se um coeficiente de correlação de 0,175 (n=3). As poáceas e oliveiras são as espécies onde existe uma melhor correlação, obtendo-se um coeficiente de 0,595 e 0,851, respetivamente. Ainda assim, é com o somatório de todas as espécies apresentadas que se obtém uma melhor correlação entre o número de embalagens vendidas para os dois grupos de medicamentos e o número de grãos de pólen no ar.

Tabela 13 - Testes de *Pearson* entre as vendas de medicamentos (grupos 1, 2 e somatório) e as espécies em estudo e o seu somatório.

	<b>Grupo 1</b>		<b>Grupo 2</b>		<b>Somatório</b>	
	<i>Person's</i>		<i>Person's</i>		<i>Person's</i>	
	R	P	R	P	R	P
<b>Plátano</b>	0,234	0,765	0,022	0,977	0,175	0,824
<b>Quercus</b>	0,5512	0,256	0,514	0,296	0,546	0,261
<b>Poáceas</b>	0,652	0,112	0,442	0,319	0,595	0,158
<b>Oliveira</b>	0,888	0,007	0,738	0,057	0,851	0,015
<b>Somatório</b>	0,915	0,003	0,844	0,016	0,902	0,005

Em resumo, as correlações mais fortes observaram-se entre o somatório dos índices dos vários tipos polínicos e a venda de fármacos ( $r=0,902$ ;  $p=0,005$ ) e com oliveira ( $r= 851$ ;  $p=0,015$ ).

Embora a época polínica das gramíneas e da oliveira decorra habitualmente entre a segunda quinzena de Abril e o mês de Maio, no Alentejo, é habitual registarem-se queixas dos doentes a partir do mês de Fevereiro. As espécies aqui consideradas apresentam a sua época polínica entre os meses de Março e Junho, registando-se as contagens mais elevadas para os meses de Maio. Quanto às vendas de medicamentos anti-alérgicos, estas atingem o pico de vendas também no mês de Maio.

É de realçar que neste estudo são apenas consideradas quatro tipos polínicos, entre eles dois tipos muito alergizantes [poáceas e oliveira; (Todo-bom et al., 2004)] e outros dois que são considerados moderadamente alergizantes [plátano e azinheira; (Todo-bom et al., 2004)] mas muito abundantes na região (Todo-bom et al., 2004) e que, em resultado da elevada exposição, podem constituir um risco para o desenvolvimento de sintomas de polinose.

Nos meses de Novembro e Dezembro há um ligeiro aumento das vendas que parece não estar correlacionado com a época polínica. Porém, apesar destes dois meses não corresponderem à época polínica principal, existem outras espécies que polinizam nesta época e que não foram consideradas no trabalho. O Cipestre (Caeiro, 2013) e algumas Betuláceas (Abreu & Ribeiro, 2005) são exemplos de espécies que polinizam nos meses de Inverno. Para além disso, estes são os meses em que aumenta a prevalência de constipações que também podem motivar a aquisição destes medicamentos (D'Amato, 2007).

Embora possam existir outros fatores que motivem a aquisição destes medicamentos no geral registou-se uma correlação positiva entre a venda de medicamentos de ambos os grupos de fármacos utilizados no tratamento da alergia, sugerindo que este poderá constituir um indicador dos sintomas de polinose durante a época polínica das espécies alergizantes da região.

### 5.1.2. Caracterização da sensibilização dos indivíduos alérgicos obtida por testes de PRICK

Neste trabalho foram utilizados 9 soros de indivíduos sensibilizados, que eram seguidos nas consultas externas de alergologia do Hospital Espírito Santo de Évora. Dos soros testados 2 pertenciam ao sexo masculino e 7 ao sexo feminino. Foram realizados testes de PRICK para todos os indivíduos, com exceção dos indivíduos S5 e S9.

Todos os indivíduos eram polisensibilizados a pólenes e apresentavam sintomas anteriores à época polínica das gramíneas, apresentando sensibilização a gramíneas e a oliveira, analisada por testes de PRICK. Em quatro casos foram feitos testes para *Quercus*, revelando-se positivo no S8. No caso de Plátano, apenas três indivíduos fizeram o teste e só o S1 se revelou positivo (tabela 14).

Tabela 14 - Quadro resumo com sensibilização dos indivíduos alérgicos (positivo: +; negativo: -; sem observação: s/o).

	Poaceae	Olea	Quercus	Platanus
S1	+	+	-	+
S2	+	+	-	-
S3	+	+	s/o	s/o
S5				
S6	+	+	s/o	s/o
S7	+	+	s/o	s/o
S8	+	+	+	
S9				
S10	+	+	-	-
S12	+	+	s/o	s/o

Em alguns casos foram também realizados testes de PRICK para os diferentes géneros da família da *Poaceae*. Assim, foram feitos testes para *Dactylis*, *Festuca*, *Lolium*, *Phleum* e *Poa*. Em qualquer dos casos todos os testes realizados foram positivos. Para os géneros *Dactylis*, *Lolium* e *Phleum*, os 6 soros foram positivos (Tabela 15).

Tabela 15 - Quadro resumo da sensibilização dos diferentes pacientes ás espécies da família *Poaceae* (positivo: +; negativo: - ; sem observação: s/o).

	Dactylis	Festuca	Lolium	Phleum	Poa
S1	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
S2	+	+	+	+	+
S3	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
S5					
S6	+	s/o	+	+	s/o
S7	+	+	+	+	+
S8	+	+	+	+	+
S9					
S10	+	+	+	+	+
S12	+	s/o	+	+	s/o

### 5.1.3. Estudo de imunorreatividade a *P.hybrida* e *Q.rotundifolia*

A sensibilização de um pequeno número de indivíduos da região de Évora a plátano e azinheira foi determinada por EAST (ver 4.2.3 de Materiais e Métodos). Nesses mesmos ensaios, foi também avaliada a existência de imunorreatividade cruzada do plátano e da azinheira com as poáceas (*D. glomerata*).

A Figura 28 mostra a imunorreatividade dos diferentes soros ao extrato proteico de *P.hybrida* antes e após inibição com extrato de *D.glomerata* (barras laranja e azuis, respetivamente).As barras a roxo mostram a percentagem de inibição observada. Os resultados evidenciam que todos os soros apresentam imunorreatividade positiva, sendo os soros S8, S9 e S10 os mais imunorreativos (mais de 70%), enquanto os soros S1, S3 e S5 apresentam valores de EAST inferiores a 40%. Os soros S2, S7 e S12 foram os menos reativos. Os resultados sugerem ainda que os soros S3, S8, S9 e S10 possuem reatividade cruzada com *D.glomerata*, uma vez que após inibição se observou um decréscimo significativo. A barra de inibição variou entre 60 a 90% (Figura 28, barras roxas). A imunorreatividade dos soros S1, S2, S5, S7 e S12 a *P.hybrida* não foi afetada pela inibição dos soros com *D.glomerata*, o que pode significar que estes soros possuem imunorreatividade primária para a espécie *P.hybrida*.

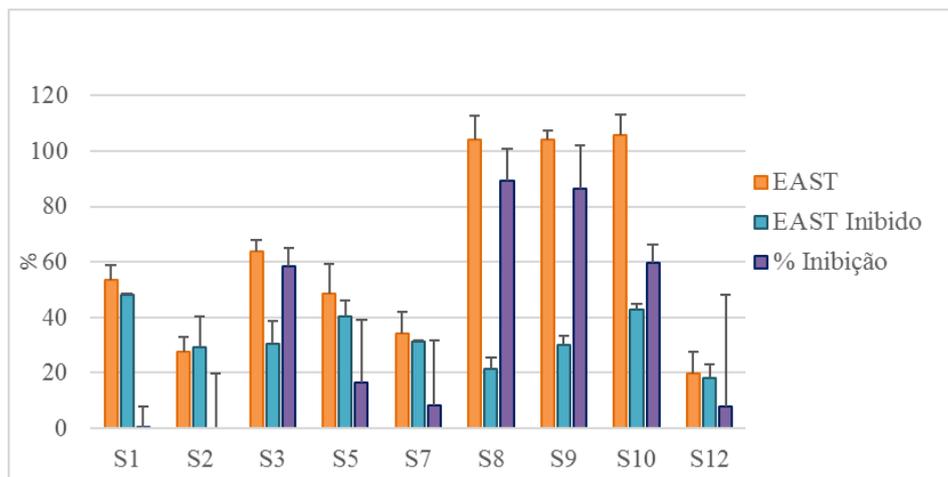


Figura 28- Determinação da sensibilização a *P.hybrida* pelo método EAST. Os gráficos apresentados são correspondentes à média de triplicados  $\pm$  DPM.

Em paralelo, foi realizada a pesquisa de imunorreatividade com o extrato de *Q. rotundifolia*. Como se pode ver na Figura 29, os soros S7, S8 e S9 foram os que apresentaram mais imunorreatividade (superior a 70%), enquanto o S1 é o menos reativo (cerca de 25%). Os restantes apresentaram imunorreatividade entre os 50% e 70%. Quanto à existência de reatividade cruzada, o gráfico sugere que os soros S1, S3, S5, S7 e S9 possuem imunorreatividade cruzada com *D.glomerata*, observando-se um decréscimo significativo no EAST inibido (Figura 29, barras azuis), onde a taxa de inibição varia entre os 30% (S2) e os 100% (S1) (Figura 29, barras roxas). Os soros S8, S10 e S12 não foram inibidos por *D.glomerata*, sugerindo que possam reagir especificamente a proteínas presentes no extrato de *Q. rotundifolia*.

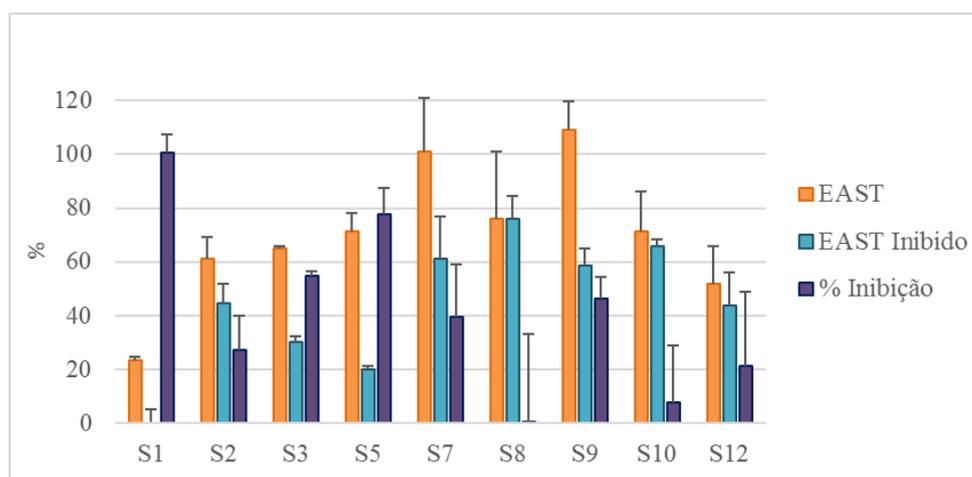


Figura 29 - Determinação da sensibilização a *Q.rotundifolia* pelo método EAST. Os gráficos apresentados são correspondentes à média de triplicados  $\pm$  DPM.

Os resultados apresentados mostram que a população estudada apresenta reatividade serológica, quer a *P.hybrida*, quer a *Q.rotundifolia* em 100% dos casos. Para além disso sugerem que essa reatividade possa ser primária para *P.hybrida* em 60% dos casos e para *Q.rotundifolia* em 40% dos casos.

De realçar que nos casos S8 e S9 a imunorreatividade a *P.hybrida* parece resultar maioritariamente de reatividade cruzada (com 90% de inibição) (Figura 28), observando-se um resultado similar em *Q. rotundifolia* para o S1 (Figura 29).

Tomando em consideração os resultados dos testes de PRICK, no caso de S1, que apresentou um teste PRICK positivo a *P.hybrida*, a inibição com *D.glomerata* não afetou a imunorreatividade registada em EAST. Este resultado foi similar ao observado no S8 no teste a *Q.rotundifolia*, onde a ausência do efeito de *D.glomerata* está em concordância com o teste de PRICK positivo observado neste indivíduo para o género *Quercus*.

Porém, a imunorreatividade serológica positiva não permite concluir sobre a indução da ativação dos mastócitos responsáveis pelos sintomas alérgicos.

#### 5.1.4. Estudo do efeito dos extratos de *Q.rotundifolia* e *P.hybrida* na desgranulação de basófilos

Para avaliar a resposta biológica induzida pelos extratos de *P.hybrida* e *Q.rotundifolia* foram realizadas experiências utilizando a linha celular RBL-h21. Para a estimulação das células foram construídas quatro pools diferentes de soros com base nos resultados obtidos em métodos anteriores, isto é, na sua reatividade primária ou cruzada com a espécie *D.glomerata*, sendo a pool 1 correspondente aos soros que possuíam reatividade primária para as espécies em estudo e a pool 2 corresponde aos soros que possuíam reatividade cruzada com *D.glomerata*. A constituição das pools encontra-se descrita na Tabela 16.

Tabela 16 - Constituição das diferentes pools de soros.

		Constituição da pool	Designação
<b>Plátano</b>	Não Inibido	S1, S2, S5, S7	PlaP1
	Inibido	S3, S8, S9, S10	PlaP2
<b>Quercus</b>	Não Inibido	S2, S8, S10, S12	QueP1
	Inibido	S1, S3, S5, S7, S9	QueP2

A Figura 30 mostra o efeito dose-resposta dos extratos sobre células sensibilizadas com PlaP1 (verde) e PlaP2 (castanho). Para o extrato de *P.hybrida* observou-se um aumento de desgranulação das células em ambos os casos PlaP1 e PlaP2 sendo as curvas maioritariamente sobreponíveis. O valor máximo de desgranulação (cerca de 25%) atingiu-se após um estímulo com 61,5 µg/mL e para a concentração mais elevada utilizada, observou-se uma diminuição da percentagem de desgranulação. É de realçar que se observou uma diferença na desgranulação induzida por 12,3 µg/mL entre a PlaP1 (~11%) e PlaP2 (~20%).

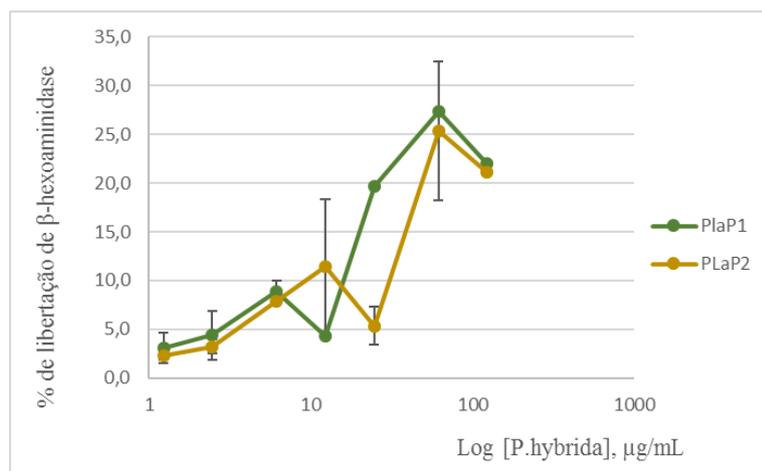


Figura 30- Curva dose-resposta obtida após sensibilização das células com duas pools diferentes de soros de indivíduos sensibilizados e estimulação com o extrato de *P. hybrida*, com células sensibilizadas com pool PlaP1 e PlaP2. Os resultados apresentados resultam da média  $\pm$  DPM, com n= 2 para cada experiência.

A par com esta experiência, foram também realizados ensaios com o extrato de *Q. rotundifolia*. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 31.

Observou-se um aumento de desgranulação das células em ambos os casos, QueP1 e QueP2, sendo a desgranulação semelhante (15% para QueP1 e 10% para QueP2). No entanto é realçar que a concentração mínima para a qual se observou efeito do extrato foi inferior no caso de QueP1, tendo-se registado uma desgranulação de 12,5% em resposta a 12 µg/mL de extrato enquanto que para QueP2 foram necessários 24 µg/mL de extrato para obter o mesmo efeito. Para QueP1 há um aumento de desgranulação até à concentração 23,4 µg/mL, sendo que o pico de desgranulação se observa para a concentração de 117 µg/mL, correspondendo a 20%. No caso de QueP2, o pico desgranulação verifica-se para a mesma concentração, mas com um valor superior (aproximadamente os 25%).

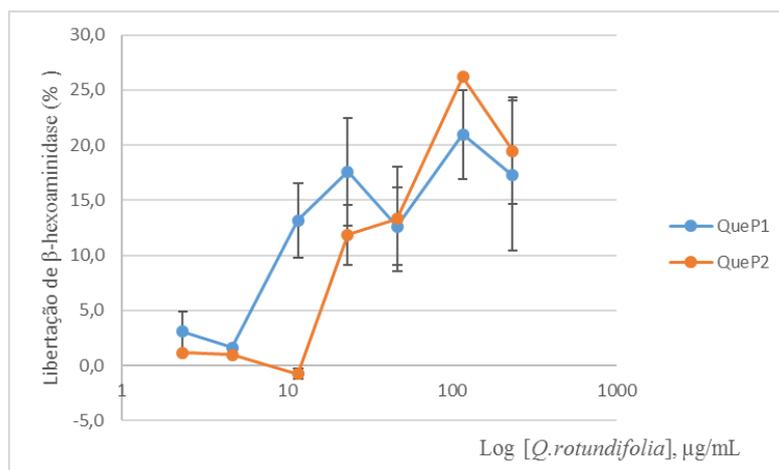


Figura 31 - Curva dose-resposta obtida após sensibilização das células com duas pools diferentes de soros de indivíduos sensibilizados e estimulação com o extrato de *Q. rotundifolia*, com células sensibilizadas com pool QueP1 e QueP2. Os resultados apresentados resultam da média  $\pm$  DPM, com n= 2 para cada experiência.

Ao analisar as curvas dose-resposta obtidas, observa-se que as duas pools de soros apresentam comportamentos distintos, com a curva dose-resposta desviada para concentrações maiores de extratos, observando-se uma maior intensidade na resposta obtida com as células sensibilizadas com QueP1 ou com PlaP1.

Os soros utilizados para a construção da pool PlaP1 e QueP1 apresentam imunorreatividade específica para plátano e azinheira, respetivamente.

Segundo os resultados obtidos por EAST, os soros utilizados para a construção da pool Pla2 e QueP2 apresentam imunorreatividade cruzada com dactila. Quer para plátano, quer para azinheira, os resultados mostram que as células marcadas com a PlaP1 e QueP1, onde a sensibilização poderá ser primária, apresentam uma maior sensibilidade para os extratos polínicos de plátano e azinheira, respetivamente, do que as células marcadas com as pools PlaP2 e QueP2.

Estes resultados sugerem que o extratos de pólenes de plátano e de azinheira possam ser responsáveis pelos sintomas *in vivo*, em resultado quer da sensibilização primária, quer por reatividade cruzada com *D. glomerata*.

## 5.2. Identificação de bandas imunorreativas nos extratos polínicos de *P.hybrida* e *Q.rotundifolia*

### 5.2.1. Identificação de bandas imunorreativas em função do pI

Para um estudo mais detalhado, mais especificamente para a identificação de bandas imunorreativas recorreu-se ao Imunoblot, com separação proteica prévia dos diferentes extratos (ver capítulo de Materiais e Métodos, ponto 4.2.4.1).

Procedeu-se à separação proteica dos extratos polínicos por isoeletrofocagem seguida de imunoblot usando os soros atrás descritos, antes (Não Inibido) e após inibição com *D.glomerata* (Inibido).

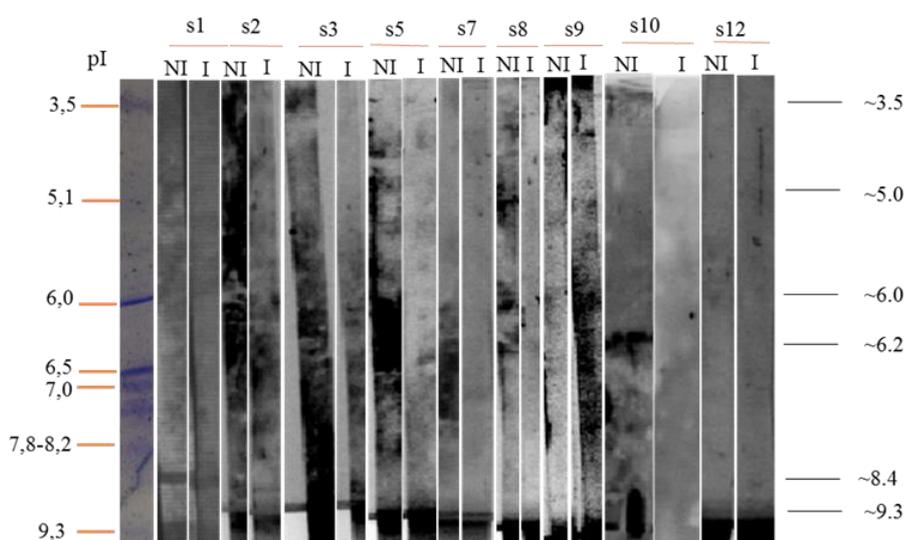


Figura 32 - Identificação de bandas imunorreativas dos diferentes soros para *P.hybrida* (NI-Não Inibido; I-Inibido).

Foi possível identificar bandas para *P.hybrida* (Figura 32 e Tabela 17) para todos os soros testados. Os resultados mostram que o soro S3 é o mais imunorreativo para plátano, pois é o soro onde foram reconhecidas mais bandas (9 bandas), seguindo-se os soros S2, S5 e S9, onde foram reconhecidas 7 bandas, enquanto os soros S7, S10 e S12 foram os menos reativos. No que diz respeito a inibições, verifica-se uma diminuição de reatividade.

Observou-se em todos os casos uma banda a 6,2, 7,7 e 9,2. Foi também identificada uma banda a 7,7 para todos os soros que pode corresponder a reatividade cruzada com *D.glomerata*, uma vez que é visível uma diminuição da intensidade de reação em soros inibidos. Sete dos nove soros apresentaram também imunorreatividade em pI 6,2. No que diz respeito a inibições, foi possível observar inibição em 4 soros para pI de 5,1, 6,2 e 7,7. Dos 9 soros testados, apenas 1 apresentou inibição para um pI 5,8, 7,1 e 8,4.

Tabela 17 - Identificação de bandas imunorreativas com base no ponto isoelétrico para a espécie *P.hybrida*  
Imunorreatividade (+); Inibição(-).

<i>P. hybrida</i>										
Banda (pI± DP)	S1	S2	S3	S5	S7	S8	S9	S10	S12	
3,6±0,07		+ - +	- + -	+ -			+ +			
4,4± 0,08		+ - +	- + -	+ -		+ +	+ +			
4,7± 0,06										
5,1± 0,17	+ + +	- + -	+ - +	- + -		+ -	+ +			
5,8 ± 0,17		+ + +	- + -	+ -			+ +			
6,0	+ - +	- + -	+ - +	- + -	+ -	+ -	+ +			
6,2± 0,16	+ + +	+ + +	+ + +	+ + -	+ -	+ +	+ +	+ +	+ -	+ +
7,1 ± 0,10	+ + +	+ + +	+ + +	+ + -	+ +					
7,7± 0,15	+ + +	+ + +	+ + +	+ + -	+ -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
8,4 ± 0,06		+ + +	+ + +				+ +	+ +	- +	+ +
9,2	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	- +	+ +

A Figura 33 diz respeito aos resultados obtidos após a separação proteica do extrato de *Q.rotundifolia*, onde foi possível identificar bandas para 8 dos 9 soros testados. Dos 9 soros testados 8 apresentam imunorreatividade a 9,2. Os soros S2 , S3, S5 e S9 apresentam uma banda a 6,2, que pode corresponder à *Dac g 1*, descrita já na bibliografia (allergome.org <sup>[9]</sup>).

A banda a 9,2 foi a mais reconhecida pelos soros testados, não desaparecendo quando os soros sofrem inibição. Em 6 dos 9 soros testados foi identificada a banda com pI 5,7. As bandas com pI de 6,2, 7,7 e 8,9 foram identificadas em 5 dos 9 soros testados. Em 7 dos 9 soros testados foi idtentificada uma banda com pI de 6,2.

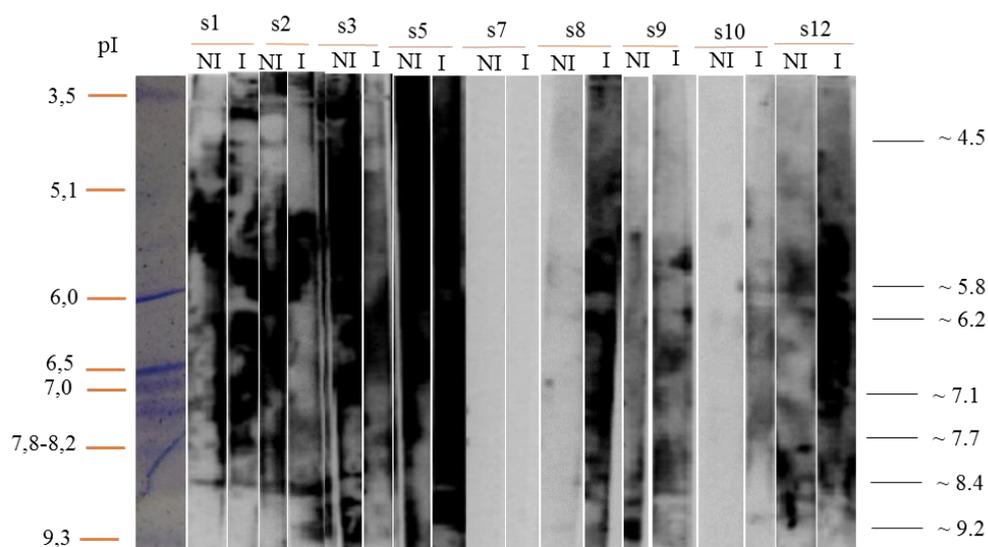


Figura 33 - Identificação das bandas imunorreativas dos diferentes soros para *Q.rotundifolia* (NI-não inibido e I-Inibido).



## 5.2. Identificação de bandas imunorreativas com base na sua massa molecular

Para além da separação proteica com base no ponto isoelétrico, procedeu-se também à identificação das bandas imunorreativas após separação proteica dos extratos de *P. hybrida*, *Q. rotundifolia* por SDS-PAGE.

Para a espécie *P. hybrida* (Figura 34) foram reconhecidas bandas com massas moleculares compreendidas entre os 10 e 76 kDa. A banda correspondente a uma massa de 19 kDa foi a mais reconhecida (5 dos 9 soros), seguindo-se a banda de 16 kDa que foi reconhecida por 4 dos 9 soros testados. Dos 9 soros, 3 reconheceram as bandas com pesos de 12kDa, 21kDa, 24 kDa, 28 kDa e 40 kDa. Todos os soros, com exceção do soro S5, S7 e S10 apresentam uma banda com uma massa molecular de aproximadamente 18 kDa.

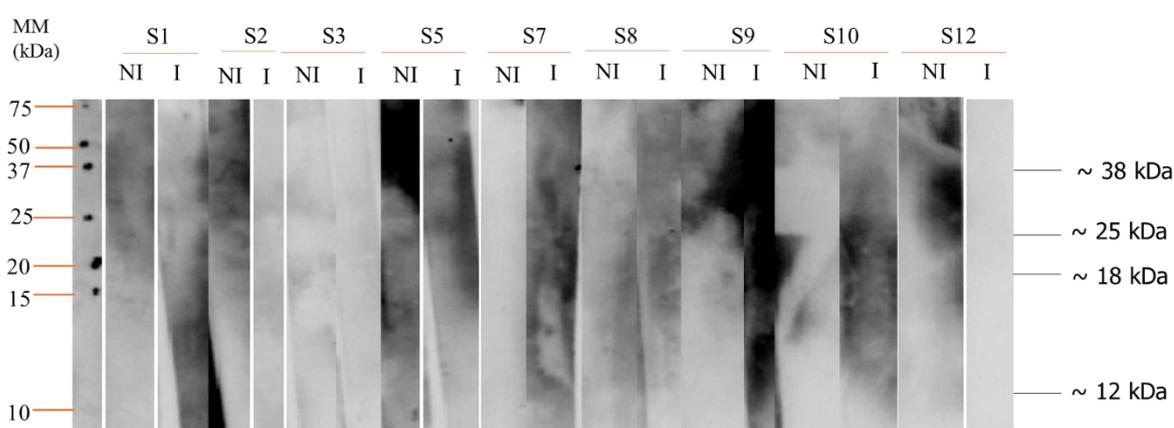


Figura 34 - Identificação de bandas imunorreativas dos diferentes soros para *P. hybrida* após separação com base na Massa Molecular (NI-não inibido e I-Inibido).

Tabela 19 - Identificação de bandas imunorreativas com base na Massa Molecular para a espécie *P. hybrida*: Imunorreatividade (+); Inibição (-).

<i>P. Hybrida</i>										
Banda (MM±DP)	S1	S2	S3	S5	S7	S8	S9	S10	S12	
76±0		+	-			+	+			+ -
74										+ -
56		+	-							
52										
48±0,7			+	-		+	+			
40±0,6	+	+						+	+	+ -
38±0,7	+	+	+	-	+	-				+ -
34±0,7								+	+	+ -
28±0,6	+	+			+	+		+	+	
25±1	+	+			+	+				
21±0,6			+	-	+	-				
18±0,5	+	+	+	-	+	-				+ -
16±3	+	+			+	+		+	+	
12±0				+	-		+	+	+	
10±0							+	+		+ -

Em relação à espécie *Q. rotundifolia* verifica-se que todos os soros testados apresentam imunorreatividade para essa espécie, uma vez que se identificaram massas moleculares entre os 10 e 69 kDa (Figura 35). A banda com massa molecular de 17 kDa foi reconhecida por todos os soros, seguindo-se a banda de 33 kDa que foi reconhecida por 6 soros.

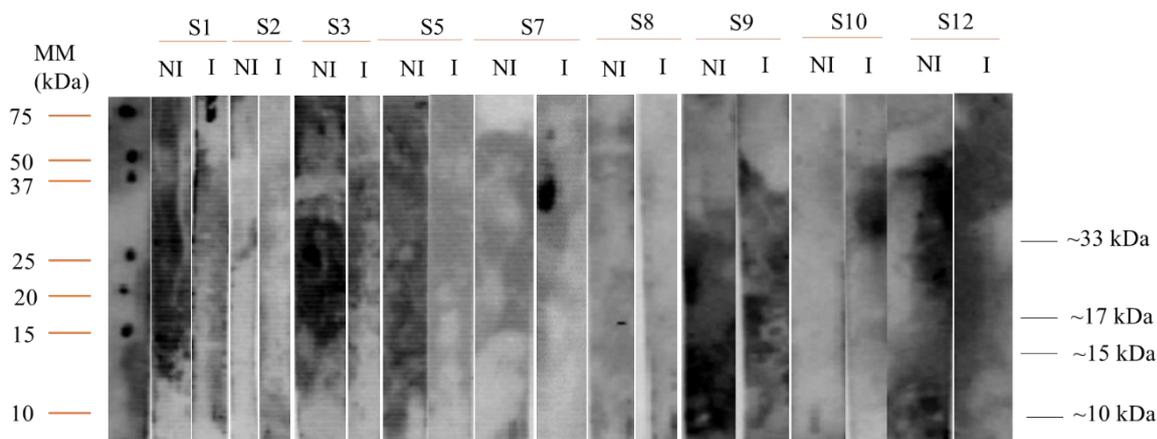


Figura 35- Identificação de bandas imunorreativas dos diferentes soros para *Q. rotundifolia* após separação com base na Massa Molecular (NI-não inibido e I-Inibido).

Tabela 20- Identificação de bandas imunorreativas com base na Massa Molecular para a espécie *Q. rotundifolia*: Imunorreatividade (+); Inibição (-).

<i>Q. rotundifolia</i>										
Banda (MM±DP)	S1	S2	S3	S5	S7	S8	S9	S10	S12	
69	+	+								
52 ± 3,2	+	-	+	-	+	+				
40 ± 1,9										
33 ± 1,7	+	+	+	+	+					
27 ± 1,4	+	+			+	+				
21 ± 1,5										
17 ± 1,0	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
15 ± 0,2	+	+	+	-						
12 ± 1,0	+	+								
10 ± 0,1										

Observam-se bandas para *P.hybrida* com massas de 18 kDa e 25 kDa, reconhecidas pela maioria dos soros. Estas podem corresponder a proteínas hómologas de Pla a 1 e Pla TLP, respetivamente, que se encontram já descritas na literatura (allergome.org<sup>[9]</sup>) e que são considerados alérgenos “major” desta espécie (Fernández-González, M. Guedes, Abreu, &

Rodríguez-Rajo, 2013). É de notar que, para além disso, todos os soros reconheceram uma banda com pI 9,2, valor de pI que pode corresponder ao alergénio Pla a 1 (allergome.org<sup>[9]</sup>).

Os alergénios de *Q. rotundifolia* ainda não se encontram caracterizados no entanto, existem alergénios descritos para outras espécies do género *Quercus*, como é o caso do Que a 1 e Que a 2, respetivamente, que apresenta uma massa molecular de 17kDa e 15 kDa.

Para além disso, existem também evidências de sensibilização da população da Península Ibérica a *Q. ilex* (Valero Galván, Valledor, González Fernandez, Navarro Cerrillo, & Jorrín-Novo, 2012), tendo já sido apresentada uma caracterização do perfil proteico desta espécie apontando para alguns alergénios.

Neste trabalho 6 dos 9 soros testados apresentam reconhecimento de uma banda com ~17kDa e 3 dos 9 soros apresentaram reconhecimento de uma banda a ~15kDa, ambas compatíveis com a ocorrência de homologia alergénica entre Que a 1 e Que a 2. Em 2 dos 9 soros foi identificada banda a 10 kDa, que poderá corresponder a Que a 4 (Tabela 8). No entanto, os resultados sugerem que estas bandas podem ser o resultado de reatividade cruzada com *D. glomerata*, que apresenta alergénios de massa comparável, como é o caso de Dac g 2 (Tabela 6- Introdução), uma vez que ocorreu inibição conclusiva desta banda pelo extrato de *D.glomerata*.

Assim, os resultados permitiram identificar alergénios de *P.hybrida* e evidenciaram que a sensibilização da população quer específica para *P.hybrida*, por exemplo Pla a 1, quer cruzada com gramíneas, possivelmente devido a proteínas homologas de Dac g 1, Dac g 4 (allergome.org<sup>[9]</sup>). Estes resultados são ainda reforçados pela observação da resposta diferencial na ativação de basófilos pelas pools PlaP1 e PlaP2.

Observou-se ainda que, embora os resultados não permitam descartar a existência de sensibilização específica a *Q. rotundifolia*, como sugerem os resultados obtidos por EAST e nas respostas celulares diferenciais para as pools QueP1 e QueP2, que podem estar mascarados nos ensaios de imunoblot muito provavelmente devido à sensibilização da população.



# *CAPÍTULO 6*

## *Conclusão*



Este trabalho teve por objetivo o estudo do perfil alergológico para *P.hybrida* e *Q.rotundifolia* na população de Évora, tendo constituído uma abordagem para a identificação das características da sensibilização da população a estas espécies, da identificação de eventuais alergénios e do eventual risco da alergia aquando da exposição a estes tipos polínicos.

Neste âmbito, os resultados apresentados mostraram que:

- I. A venda de medicamentos para o tratamento da alergia aumenta significativamente durante a Primavera, quando ocorre a época polínica principal, registando-se um aumento em Março, anterior às gramíneas e oliveira e consistente com a época polínica de plátano e azinheira;
- II. Registou-se sensibilização a plátano e azinheira em todos os indivíduos da população estudada, resultante quer de reatividade primária quer de reatividade cruzada;
- III. Os extratos de pólen de plátano e azinheira induziram desgranulação de basófilos evidenciando a sua ação alergizante independentemente de esta resultar de reatividade primária ou cruzada;
- IV. Foram identificados alergénios em ambas as espécies, que carecem de caracterização para a sua identificação e classificação;

Em conclusão, embora em cerca de metade dos casos, a imunorreatividade pareça resultar principalmente de reatividade cruzada com gramíneas, estes resultados sugerem que a exposição ao pólen de plátano e azinheira pode contribuir para o agravamento dos sintomas pré-época observados em alguns indivíduos e apontam para um papel relevante destas espécies na doença alérgica respiratória registada na região de Évora, tendo assim impactos significativos na saúde.



## *Referências Bibliográficas*



- Alcaraz, J. A. (1996). *Vegetación y Flora de Extremadura*. Espanha.
- Alcázar, P., Galán, C., Torres, C., & Domínguez-Vilches, E. (2015). Detection of airborne allergen (Platanus a 1) in relation to Platanus pollen in Córdoba, South Spain. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(1), 96–101.
- Alcázar, P., García-Mozo, H., Trigo, M., Ruiz, L., González-Minero, F. J., Hidalgo, P., ... Galán, C. (2011). Platanus pollen season in Andalusia (southern Spain): trends and modeling. *Journal of Environmental Monitoring*, 13, 2502–2510.
- Amersham. (1998). Guide to Isoelectric Focusing. *Amersham Bioscience*, 5(5), 1–29.
- Arosa, F. A., Cardoso, E. M., & Pacheco, F. C. (2007). *Fundamentos de Imunologia* (Lidel).
- Asturias, J. a, Ibarrola, I., Bartolomé, B., Ojeda, I., Malet, a, & Martínez, a. (2002). Purification and characterization of Platanus a 1, a major allergen from Platanus acerifolia pollen. *Allergy*, 57(3), 221–227.
- Barsumian, E. L., Isersky, C., Petrino, M. G., & Siraganian, R. P. (1981). IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. *European Journal of Immunology*.
- Berger, A. (2002). Skin Prick Testing. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 325(7361), 414.
- Bio-Rad. (2007). Mini-PROTEAN Tetra Cell Instruction Manual. *Chemical Senses*, 39(5), 1–28.
- Bohle, B. (2014). Allergens and cross-reactivity. In *Global Atlas Allergy* (pp. 11–12).
- Bousquet, J., Heinzerling, L., Bachert, C., Papadopoulos, N. G., Bousquet, P. J., Burney, P. G., ... Demoly, P. (2012). Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy*, 67(1), 18–24.
- Caeiro, E. (2013). *Aerobiologia do Pólen Poaceae, Olea europaea L. e Platanus hybrida Brot. e Potenciais Repercussões na Doença Alérgica Respiratória no Sul de Portugal*. Évora.
- Caeiro, E., & Nunes, C. (2014). Análise das concentrações de pólen de gramíneas na atmosfera de Portugal Continental. *Rev Por Imunoalergol*, 22(2), 125–138.
- Calderon, M. A., Demoly, P., Gerth van Wijk, R., Bousquet, J., Sheikh, A., Frew, A., ... Papadopoulos, N. (2012). EAACI: A European Declaration on Immunotherapy. Designing the future of allergen specific immunotherapy. *Clinical and Translational Allergy*, 2(1), 20.
- Chirumbolo, S. (2012). State-of-the-art review about basophil research in immunology and allergy: is the time right to treat these cells with the respect they deserve? *Blood*

- Transfusion Trasfusione Del Sangue*, 10(2), 148–64.
- Cramer, R. (2014). In vitro allergy diagnosis - Allergen - Specific IgE. In *Global Atlas of Allergy* (pp. 166–167).
- D'Amato, G. (2007). Pollen allergy in Europe. *The UCB Institute of Allergy*, 6(Figure 1), 1–12.
- Darrow, L. A., Hess, J., Rogers, C. A., Tolbert, P. E., Klein, M., & Sarnat, S. E. (2012). Ambient pollen concentrations and emergency department visits for asthma and wheeze. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(3), 630–638.e4.
- Duque, L., Guimarães, F., Ribeiro, H., Sousa, R., & Abreu, I. (2013). Elemental characterization of the airborne pollen surface using Electron Probe Microanalysis (EPMA). *Atmospheric Environment*, 75, 296–302.
- Eccleston, E., Leonard, B. J., Lowe, J. S., & Welford, H. (1973). Basophilic leukaemia in the albino rat and a demonstration of the basopoietin. *Nature New Biology*, 244, 73–76.
- Fahlbusch, B., W-D, M., Rudeschko, O., Jäger, L., Cromwell, O., & Fiebig, H. (1998). Detection and quantification of group 4 allergens in grass pollen extracts using monoclonal antibodies. *Clin Exp Allergy*, 28(7):799-807.
- Fernández-González, M., Guedes, A., Abreu, I., & Rodríguez-Rajo, F. J. (2013). Pla a<sub>1</sub> aeroallergen immunodetection related to the airborne Platanus pollen content. *Science of the Total Environment*, 463–464, 855–860.
- Fernández, E., & Galván, A. (2006). Métodos para la cuantificación de proteínas. *Departamento de Bioquímica*, 1–7. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar:Métodos para la cuantificación de proteínas>
- Ferreira, F., Hawranek, T., Gruber, P., Wopfner, N., & Mari, A. (2004). Allergic cross-reactivity: From gene to the clinic. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 59(3), 243–267.
- Galli, S. J. (2014). Mast Cells. In *Global Atlas Allergy* (p. 53).
- Genser, J. K., & Schmid-Grendelmeier, P. (2014). In vivo allergy diagnosis - Skin Testes. In *Global Atlas of Allergy* (pp. 150–152).
- Hajime Karasuyma. (2014). Basophils. In *Global Atlas Allergy* (p. 56).
- Hoffman, H. J. (2014). In vitro allergy diagnosis - cellular allergy testing. In *Global Atlas of Allergy* (pp. 171–172).
- Jianan, X., Zhiyun, O., Hua, Z., Xiaoke, W., & Hong, M. (2007). Allergenic pollen plants and their influential factors in urban areas. *Acta Ecologica Sinica*, 27(9), 3820–3827.

- John B. Zabriskie, M. D. (2009). *Essential Clinical Immunology*.
- Jr, J. C., P, T., M, W., & Shlochick, M. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5th editio). New York: Garland Science. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27112/>
- Kaul, S., Lüttkopf, D., Kastner, B., Vogel, L., Höltz, G., Vieths, S., & Hoffmann, A. (2007). Mediator release assays based on human or murine immunoglobulin E in allergen standardization. *Clinical and Experimental Allergy*, *37*(1), 141–150.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007). Kuby Immunology. *Kuby Immunology*, *6*, 574.
- LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, *112*(5), 1570–1580.
- Lumaret, R., Mir, C., Michaud, H., & Raynal, V. (2002). Phylogeographical variation of chloroplast DNA in holm oak (*Quercus ilex* L.). *Molecular Ecology*, *11*(11), 2327–2336.
- McComb, S., Thiriot, A., Krishnan, L., & Stark, F. (2013). Introduction to the immune system. *Methods in Molecular Biology*, *1061*, 1–20.
- Mesquita Júnior, D., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T. T., Souza, A. W. S. de, Cruvinel, W. de M., Andrade, L. E. C., .... (2010). Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira de Reumatologia*, *50*(5), 552–580.
- Pakrasit, H. B., Andersson, B., & Norling, B. (2002). Proteomics of allergens. *Molecular & Cellular Proteomics*, *771*, 956–966.
- Pandey, V. (2016). Hay fever & homeopathy: a case series evaluation. *Homeopathy*, 1–7.
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, *357*(9270), 1777–1789.
- Parveen, I., Winters, A., Threadgill, M. D., Hauck, B., & Morris, P. (2008). Extraction, structural characterisation and evaluation of hydroxycinnamate esters of orchard grass (*Dactylis glomerata*) as substrates for polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, *69*(16), 2799–806.
- Princípio de Teste IgE Total ImmunoCAP - Phadia - Setting the Standard - Phadia.com. (n.d.). Retrieved March 7, 2016, from <http://www.phadia.com/pt-PT/5/Products/Ensaio/ImmunoCAP-Total-IgE/Principio-de-Teste-IgE-Total-ImmunoCAP/>
- Puc, M. (2003). Characterisation of pollen allergens. *Annals of Agriculture and Environmental*

- Medicine*, 10(2), 143–149.
- Rede Portuguesa de Aerobiologia. (2015). Rede Portuguesa de Aerobiologia. Retrieved October 24, 2015, from <http://www.rpaerobiologia.com/>
- Rižner, T. L. (2014). Teaching the structure of immunoglobulins by molecular visualization and SDS-PAGE analysis. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 42, 152–159.
- Rodríguez -Rajo, F., G, A., JA, F.-L., MJ, A., MV, J.--R., & JC, M. (2010). Evaluation of atmospheric Poaceae pollen concentration using a neural network applied to a coastal Atlantic climate region. *Neural Networks*, 23:419-25.
- Sohi, D. K., & Warner, J. O. (2008). Understanding allergy. *Paediatrics and Child Health*, 18(7), 301–308.
- Stone, K. D., Prussin, C., & Metcalfe, D. D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S73–S80.
- Taketomi, E. A., Ferreira, P., Moreira, D. S., Assis, F. De, & Vieira, M. (2006a). Doença alérgica polínica: polens alergógenos e seus principais alérgenos. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 72(4), 562–567.
- Taketomi, E. A., Ferreira, P., Moreira, D. S., Assis, F. De, & Vieira, M. (2006b). Pollen allergic disease: pollens and its major allergens, 72(4), 562–567.
- Todo-bom, A., Nunes, C., & Caeiro, E. (2004). Tipos Polínicos Alergizantes em Portugal - Calendário de 2002 a 2004, 41–50.
- Tormo-Molina, R., Maya-Manzano, J.-M., Silva-Palacios, I., Fernández-Rodríguez, S., & Gonzalo-Garijo, Á. (2015). Flower production and phenology in *Dactylis glomerata*. *Aerobiologia*, 31(4), 469–479.
- Valero Galván, J., Valledor, L., González Fernandez, R., Navarro Cerrillo, R. M., & Jorrín-Novo, J. V. (2012). Proteomic analysis of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) pollen. *Journal of Proteomics*, 75(9), 2736–2744.
- Vogel, L., Lüttkopf, D., Hatahet, L., Haustein, D., & Vieths, S. (2005). Development of a functional in vitro assay as a novel tool for the standardization of allergen extracts in the human system. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 60(8), 1021–1028.
- West, S. (2004). *Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide*.
- Wilson, A. P., Pullar, C. E., Camp, A. M., & Helm, B. A. (1993). Human IgE mediates stimulus

secretion coupling in rat basophilic leukemia cells transfected with the alpha chain of the human high-affinity receptor. *European Journal of Immunology*, 23, 240–244.

Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.*, 28(1), 445–489. <http://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>. Differentiation

### **Sites Consultados**

- [1] [www.missinglink.ucsf.edu](http://www.missinglink.ucsf.edu) (Consultado a 10 de Fevereiro de 2016)
- [2] [www.static.abdserotec.com](http://www.static.abdserotec.com) (Consultado a 10 de Fevereiro de 2016)
- [3] [www.allergyclinic.co.uk](http://www.allergyclinic.co.uk) (Consultado a 10 de Fevereiro de 2016)
- [4] [www.phadia.com](http://www.phadia.com) (Consultado a 15 de Agosto de 2016)
- [5] [www.raphaels7.wordpress.com](http://www.raphaels7.wordpress.com) (Consultado a 17 de Abril de 2016)
- [6] [www.uc.pt](http://www.uc.pt) (Consultado a 14 de Março de 2016)
- [7] [www.flora-on-pt](http://www.flora-on-pt) (Consultado a 10 de Fevereiro de 2016)
- [8] [www.jb.utad.pt/](http://www.jb.utad.pt/) (Consultado a 6 de Dezembro de 2015)
- [9] [www.allergome.org](http://www.allergome.org) (Consultado a 27 de Fevereiro de 2016)
- [10] [www.arvoresdeportugal.free.fr](http://www.arvoresdeportugal.free.fr) (consultado a 14 de Abril de 2016)
- [11] [www.plantarumaarvore.org](http://www.plantarumaarvore.org) (Consultado a 12 de Maio de 2016)
- [12] [www.sombra-verde.blogspot.pt](http://www.sombra-verde.blogspot.pt) (Consultado a 10 de Abril de 2016)
- [13] [www.florestar.net](http://www.florestar.net) (Consultado a 13 de Julho de 2016)
- [14] [www.naturdata.com](http://www.naturdata.com) (Consultado a 17 de Fevereiro de 2016)
- [15] [www.pharmallerga.com](http://www.pharmallerga.com) (Consultado a 20 de Março de 2016)
- [16] [www.plantasyhongos.es](http://www.plantasyhongos.es) (Consultado a 14 de Janeiro de 2016)
- [17] [www.protocolosonline.com](http://www.protocolosonline.com) (Consultado a 9 de Outubro de 2015)
- [18] [www.genscript.com](http://www.genscript.com) (Consultado a 15 de Novembro de 2015)



# *Anexos*



## Lista de Reagentes

- Ácido Acético (VWR);
- Ácido Fosfórico (Merck);
- Anfólitos (Fluka);
- Anti-IgE Humana (Fa. Dako #A0094);
- Azida de sódio;
- Azul de Comassie G-250 (Sigma- Aldrich);
- Bicarbonato de Sódio (Sigma Aldrich);
- Bis/ Acrilamida (PlusOne);
- BSA (Sigma Aldrich);
- Coomassie Blue R-250 (VWR);
- DTT;
- Etanol (VWR);
- Glicerol (Bio-Rad);
- Glicina (Bio-Rad);
- HCl (Sigma-Aldrich);
- H<sub>2</sub>O destilada e bi-destilada;
- Metanol (VWR);
- NaCl (Sigma-Aldrich);
- NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich);
- Persulfato de Amónio (Seurobio);
- Ponceau S (AMRESCO);
- Riboflavina;
- SDS (VWR);
- Tris (Sigma-Aldrich);
- TEMED (Serobio);
- Twen-20 (VWR);
- P- nitrofenol (Calbiochem);

## **Lista de Materiais**

- Balões volumétricos
- Esguicho
- Espátulas
- Etiquetas
- Frascos de cultura celular
- Gelo
- Gobelés
- Luvas descartáveis
- Magnetes
- Mascara descartável
- Microplacas
- Microtubos estéreis e não estéreis
- Micropipetas P10, P20, P100, P200, P1000, P5000 e respectivas pontas
- Micropipeta multicanal
- Microtubos não estéreis
- Membrana de PVDF
- Membrana de nitrocelulose
- Parafilme
- Pinças
- Placas de 96 poços
- Placas de 96 poços para cultura de células
- Tubos de falcon (15 e 50 mL)

## **Lista de equipamentos**

- Agitador magnético (Labinco)
- Balança Analítica (Metler HK 160)
- Banho seco (Grant)
- Bio-Rad Gel doc (sistema e software)
- Câmara de fluxo laminar (Nuair)
- Câmara de Neubauer
- Centrifuga de bancada (*spin*) (Cleaver Scientific Ltd)
- Centrifuga (Hettich zentrifugen)
- Congelador
- Cronómetro
- Medidor de pH: Inolab pH Level 1
- Microscópio ótico (Olympus)
- Sistema de eletroforese Mini-Protean-3 da Bio Rad (USA)
- Leitor de microplacas
- Sistema IEF Model 111 Mini IEF Cell da Bio-Rad
- Trans-Blot Eletroforetic Cell da Bio-Rad

### Preparação dos padrões de BSA

[BSA] stock = 2mg/mL → A partir desta preparou-se a de 1 mg/mL

Branco	Volume Stock 2	Tampão Fosfato
0 µg/mL	----	1mL
10 µg/mL	10 µL	990 µL
20 µg/mL	20 µL	980 µL
30 µg/mL	30 µL	970 µL
40 µg/mL	40 µL	960 µL
60 µg/mL	60 µL	940 µL
80 µg/mL	80 µL	920 µL
100 µg/mL	100 µL	900 µL
120 µg/mL	120 µL	880 µL
150 µg/mL	150 µL	850 µL
200 µg/mL	200 µL	800 µL

Os padrões preparados foram armazenados no congelador até nova utilização.

### Preparação de Soluções

#### *Quantificação de proteína*

#### **Reagente de Bradford**

Para 200 mL de solução dissolver vigorosamente 0,020g de azul de comassie G-250 em 12,5 mL de etanol 95%. Adicionar à solução 25 mL de ácido fosfórico 85%. Diluir para 200 mL de água ultrapura e filtrar.

## *Focagem Isoelétrica em gel de policrilamida*

### **Concentrado de monómeros (T= 25%, C= 3%)**

- Acrilamida 24,25 % (w/v)
- Bisacrilamida 0,75% (w/v)

### **Riboflavina ((FMN) 0,1% (w/v))**

- 50 mg de riboflavina
- 50 mL de água bidestilada

### **APS 10% (preparar na hora)**

Dissolver 0,250g de persulfato de amónio em 250 µL de água bidestilada.

### **Glicerol (25% (w/v))**

- 25 mL de glicerol
- 75 mL água bidestilada

### **Solução fixadora**

- 30% metanol
- 5% TCA
- 3,5% ácido sulfossalicílico

### **Solução corante**

Para 200 mL de água bidestilada:

- 0,2% azul de comassie R-250
- 28% etanol
- 14% ácido acético

### **Solução descorante I**

Para 200 mL de água bidestilada:

- 0,5% sulfato de cobre II
- 28% etanol
- 14% ácido acético glacial

### **Solução descorante II**

Para 200 mL de água bidestilada:

- 25% etanol
- 7% ácido acético

## ***SDS-PAGE***

### **Acrilamida/Bis (30% T; 2,26 % C)**

Para 300 mL de água destilada:

- 86,6 g de acrilamida
- 2,4 g N'N' - bis-metileno-acrilamida

Filtrar e armazenar a 4°C, no escuro (30 dias no máximo)

### **SDS 10% (W/V)**

Dissolver 10 g de SDS em 90 mL de água, com agitação suave. Perfazer até 100 mL. Guardar à temperatura ambiente até 6 meses.

### **Tris-HCL, 1.5M, pH 8.8**

Dissolver 18,15g em aproximadamente 60 mL de água destilada. Ajustar o pH a 8.8 com HCl. Perfazer até 100 mL Guardar até 3 meses a 4°C no escuro.

### **Tris-HCL 0.5M, pH 6.8**

Dissolver 6g em aproximadamente 60 mL de água destilada. Ajustar o pH a 6.8 com HCL. Perfazer até 100 mL. Guardar até 3 meses a 4°C no escuro.

**Tampão da amostra 6X (Tris HCL 300 mM, pH 6.8, SDS 12%, Glicerol 30%, Azul de Bromofenol 0,06%DTT 600 mM)**

- 3 mL Glicerol
- 1 mL Tris-HCl 1,5M, pH 6,8
- 0,6g SDS
- 0,4626g DTT
- 0,0003g azul bromofenol

Adicionar água até 5 mL. Aliquotar e guardar a -20°C até 6 meses.

**APS 10% (preparar na hora)**

Dissolver 0,250g de persulfato de amônio em 250 µL de água bidestilada.

**Coomassie Stain**

- 72,06g Glicina
- 5g SDS

Dissolver e perfazer até 1L com água desionizada. Não ajustar o pH com ácido ou base. Guardar a 4°C. Se ocorrer precipitação, colocá-lo à temperatura ambiente antes de utilizar.

**%(v/v), ácido acético 10% (v/v), Coomassie 0,5% (m/v)**

Para 1 mL de solução adicionar:

- 450 mL MeOH
- 100 mL ácido acético glacial
- 5g Coomassie Brilliant Blue

Filtrar a solução e armazená-la, protegida da luz à temperatura ambiente.

**Solução Corante (MeOH 40% (v/v), Ácido acético 10% (v/v) Coomassie 0,1% (m/v))**

Para 1 L de solução adicionar:

- 400 mL MeOH
- 100mL ácido acético glacial
- 1g Coomassie Brilliant Blue

Filtrar a solução e armazená-la, protegida da luz, à temperatura ambiente

### **Solução Descorante (MeOH 30% (v/v), Ácido acético 10% (v/v))**

Para 1 L de solução adicionar:

- 300 mL MeOH
- 70mL ácido acético glacial

Guardar à temperatura ambiente.

## *Imunobloting*

### **Tampão de transferência (Tris 25 mM, pH 8.3, Glicina 192 mM, MeOH 20%, SDS 0,037%)**

Para 1 L de solução adicionar:

- 3,03 g Tris
- 14,4g Glicina
- 200 mL metanol (grau analítico)
- 0,37 g SDS ou 3,7 mL solução SDS 10%

Não adicionar ácido ou base para ajustar o pH.

### **Ponceau S (0,2%)**

Para 100 mL de água bidestilada:

- 0,2g de Ponceau S
- 3 mL de ácido acético

### **TBS 10X (Tris HCL 250 mM, NaCL 1.5M, pH 7.6)**

Para 1L de solução, adicionar:

- 30,28g de Tris
- 87,66 NaCL

Acertar o pH e guardar a 4°C.

### **TBS- T 1X ( Tris HCL 25 mM, NaCL 150 mM, Tween- 20 0.1%, pH 7.6)**

Para 1L de solução, adicionar:

- 100 mL de TBS 10X
- 1 mL de Tween-20

Acertar o pH e guardar a 4°C.

## *Ensaio com células RBL*

### **Tampão Tyrodes 20X**

Para 1L de solução, adicionar:

- 160g NaCl (2,89M)
- 4g KCl (0,054 M)
- 1g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,0064 M)
- 2g MgCl<sub>2</sub> X H<sub>2</sub>O (0,0098 M)

### **Tampão Tyrodes 1X de lavagem**

Para 1L de solução, adicionar:

- 50 mL Tyrodes 20X
- 1,11 g CaCl<sub>2</sub> (1M)
- 1 g Glucose
- 2,4 g HEPES

### **Tampão Tyrodes 1X de diluição**

Para 500 mL de solução, adicionar:

- 25 mL Tyrodes 20X
- 0,7 mL CaCl<sub>2</sub> (1M)
- 0,5 g Glucose
- 1,2 g HEPES
- 250 mL D<sub>2</sub>O

Acetar o pH a 7,45 (titular com 10 N NaOH). Armazenar no congelador.

### **0,4 M Solução de ácido cítrico monohidratado**

Para 500 mL de solução adicionar 38,42 g ácido cítrico monohidratado. Acertar o pH até 1,75 (titular com 10% HCl)

### **1% Triton X**

- 0,5 mL Triton X
- 49,5 mL PBS

### **Solução Stop**

- 3,754 g Glicina
- 250 mL de água

Acertar o pH a 10,7 (titular com 10 N NaOH). Armazenar a 4°C

### **Versênio**

- 100 mL PBS
- 0,55 mL EDTA (100 mM)

### **Meio de Cultura DMEM**

- 2,5g meio DMEM
- 0,55 g bicarbonato

Acrescentar 250 mL de água e acertar o pH a 7,1.