



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

**Efeitos de poluentes atmosféricos na alergenicidade do pólen
de *Platanus hybrida***

Marta Feliciano Silva Otilio

Orientador(es) | Célia M. Antunes
Ana Rodrigues Costa

Évora 2020



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

**Efeitos de poluentes atmosféricos na alergenicidade do pólen
de *Platanus hybrida***

Marta Feliciano Silva Otilio

Orientador(es) | Célia M. Antunes
Ana Rodrigues Costa

Évora 2020



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

- Presidente | António Paulo da Silva Teixeira (Universidade de Évora)
- Vogal | Rui Manuel Alves Ferreira (Universidade de Évora)
- Vogal-orientador | Ana Rodrigues Costa (Universidade de Évora)

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais e à minha irmã,
porque a eles devo tudo o que sou hoje.

Apoios



Instituto de Ciências da Terra
Institute of Earth Sciences



Este trabalho foi co-financiado pela União Europeia através do Fundo de Europeu de Desenvolvimento Regional, enquadrado no COMPETE 2020 (Competitividade e Internacionalização do Programa Operacional), através do projeto ICT (UID/GEO/04683/2013) com a referência POCI-01-0145-FEDER-007690, bem como por Fundos Nacionais através da FCT para o projeto PTDC/ATP-EAM/0817/2014.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de começar por agradecer à Escola de Ciências e Tecnologias da Universidade de Évora, ao Departamento de Química, ao Instituto de Ciências da Terra, à Fundação para a Ciência e Tecnologia, ao COMPETE 2020 e ao Portugal 2020.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Costa, por todo o apoio prestado a todos os níveis, compreensão, sugestões, conselhos, críticas e conhecimentos transmitidos.

À minha Co-orientadora, Professora Doutora Célia Antunes, por toda a ajuda, compreensão, disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

Agradeço à professora Maria João Costa pela sua disponibilidade, e a Copernicus e ESA pelos dados de Sentinel-5P fornecidos.

Agradeço à minha colega de laboratório Ana Galveias por todo o apoio, pelo bom ambiente de trabalho, disponibilidade e ajuda ao longo da concretização deste trabalho.

Quero agradecer também à minha família, em particular aos meus pais e irmã, por todo o apoio que me deram ao longo do meu percurso na Universidade de Évora.

Um agradecimento especial ao Márcio por todos os momentos de compreensão, apoio e palavras de incentivo, desde o primeiro dia.

Índice geral

Apoios	iii
Agradecimentos	iv
Índice geral	vi
Índice de figuras	ix
Abreviaturas	xi
Capítulo I: Introdução	1
1.1. Poluentes atmosféricos e o tráfego automóvel	3
1.1.1. Gases e matéria particulada.....	3
1.1.2. Zonas urbanas vs. Zonas rurais	5
1.2. Efeito de poluentes no pólen	6
1.2.1. Efeito sobre as funções biológicas e reprodução.....	7
1.2.2. Efeitos físico-químicos	8
1.2.3. Alterações proteicas motivadas pelos poluentes atmosféricos.....	9
1.2.4. Alteração de composição de alergénios	9
1.2.5. Partículas subpolínicas.....	10
1.3. Efeito alergénico da combinação de poluentes atmosféricos e material biológico derivado do pólen.....	11
1.4. <i>Platanus hybrida</i>	12
1.4.1. Caracterização da espécie	12
1.4.2. O pólen de <i>Platanus hybrida</i>	13
1.4.3. Efeito de poluentes ambientais no pólen de <i>P. hybrida</i>	16
Capítulo II: Objetivos.....	19
2.1. Objetivos	21
2.1.1. Objetivo geral.....	21

2.1.2. Objetivos específicos	21
Capítulo III: Materiais e métodos	23
3.1. Estratégia	25
3.1.1. Local de realização	25
3.1.2. Período de realização	25
3.1.3. Amostras	25
3.1.4. Técnicas utilizadas	25
3.2. Esquema do procedimento experimental	26
3.3. Metodologia	27
3.3.1. Reagentes	27
3.3.2. Definição dos locais de amostragem	27
3.3.3. Caracterização da qualidade do ar nos locais de amostragem	27
3.3.4. Colheita de amostras	28
3.3.5. Dados do índice polínico	28
3.3.6. Avaliação de produção polínica	29
3.3.7. Preparação de extratos de proteínas solúveis	30
3.3.7.1. Para proteómica	30
3.3.7.2. Para ELISA	30
3.3.8. Quantificação proteica	32
3.3.9. Quantificação do alergénio major de <i>P. hybrida</i> (Pla a 1) por ELISA	33
3.3.10. Identificação de bandas imunorreativas por <i>immunoblotting</i>	35
3.4. Análise dos eletroforetogramas	40
3.5. Análise estatística	40
Capítulo IV: Resultados e Discussão	42
4.1. Caracterização dos níveis polínicos e do alergénio Pla a 1 em amostras de ar representativas da zona de Évora	44

4.2.	Caracterização da qualidade do ar	46
4.3.	Efeitos dos poluentes nas características do pólen	49
4.3.1.	Avaliação da produção polínica em ambiente urbano e rural	49
4.3.2.	Determinação do efeito da qualidade do ar na proteína total e na expressão do alérgeno <i>major</i> de <i>P. hybrida</i> (Pla a 1)	51
4.3.2.1.	Avaliação da quantificação proteica	51
4.3.2.2.	Avaliação da relação entre Pla a 1 e pólen por ELISA	51
4.3.3.	Estudo comparativo do perfil proteico do pólen de <i>P. hybrida</i> e identificação de bandas imunorreativas	52
Capítulo V:	Considerações Finais	53
Capítulo VI:	Referências Bibliográficas	53

Índice de figuras

Figura 1: Pólen de <i>P. hybrida</i> observado em microscópio ótico, na ampliação de 400x.....	13
Figura 2: Índices percentuais anuais de pólen das famílias polínicas mais relevantes em Évora.	14
Figura 3: Locais de amostragem, respetivas imagens e coordenadas geográficas.	27
Figura 4: Microscópio ótico utilizado na identificação e quantificação de pólen.	29
Figura 5: Processo da avaliação da produção polínica.	29
Figura 6: Liofilizador utilizado.....	31
Figura 7: Quantificação de proteína.....	32
Figura 8: Procedimentos de ELISA.	33
Figura 9: Quantificação de Pla a 1 por ELISA em amostras.....	35
Figura 10: Preparação de géis e sistema eletroforético e eletroforese a decorrer.....	38
Figura 11: Processo de transferência eletroforética.	39
Figura 12: Membranas em solução de bloqueio após transferência eletroforética.....	39
Figura 13: Valores de grãos de pólen por m ³ de ar em Évora, nos anos de 2018 e 2019, nas respetivas épocas polínicas de <i>P. hybrida</i>	44
Figura 14: Perfil de pólen por m ³ de ar e quantidade de alergénio Pla a 1 por m ³ de ar, em Évora, na época polínica de <i>P. hybrida</i> no ano de 2018.....	45
Figura 15: Correlação entre a concentração de alergénio Pla a 1 e o número de grãos de pólen por m ³ de ar, em Évora, no ano de 2018.	45
Figura 16: Dados de uRAD monitor a3.	46
Figura 17: Coluna troposférica de NO ₂ sobre o concelho de Évora, obtida através do instrumento TROPOMI a bordo do satélite ESA Sentinel-5P.	48
Figura 18: Grãos de pólen por antera em cada inflorescência.....	49
Figura 19: Valores de grãos de pólen/antera por árvore e <i>boxplot</i> representativo dos valores por zona, em Évora e na Mitra em 2019.	50
Figura 20: Comparação da relação proteína/pólen numa zona urbana (Évora) e numa zona rural (Mitra) nos anos de 2018 e 2019.	51
Figura 21: Relação entre Pla a 1 e proteína, bem como Pla a 1 e pólen, em Évora e Mitra nos anos de 2018 e 2019.....	52
Figura 22: Bandas de <i>immunoblotting</i>	53

Figura 23: Áreas de pico correspondentes a cada massa molecular identificada e respetivos desvios padrão, de Évora e Mitra, no ano de 2019.53

Abreviaturas

ANOVA – Análise de Variância, do inglês *Analysis of Variance*

SD – Significativamente diferente, do inglês *Standard deviation*

PM – Matéria particulada, do inglês *Particulate matter*

ELISA – Ensaio de imuno-absorção com detecção enzimática, do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*

T-X 100 – Triton-X 100

BSA – Albumina de soro bovino, do inglês *Bovine serum albumine*

BCA – Método do ácido bicinconínico, do inglês *Bicinchoninic acid assay*

PBS – Tampão de fosfatos salino, do inglês *Phosphate buffer saline*

POX – Estreptavidina-peroxidase, do inglês *Streptavidin-peroxidase*

TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecil sulfato de sódio, do inglês *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*

SDS – Duodecil sulfato de sódio, do inglês *Sodium dodecyl sulphate*

TEMED – Tetrametiletilenodiamina

TBST – Tampão Tris salino, suplementado com Tween 20, do inglês *tris buffered saline supplemented with Tween 20*

Tris – tris(hidroximetil)aminometano, do inglês *tris(hydroxymethyl)aminomethane*

pH – Potencial de hidrogénio

Ig – Imunoglobulina

APS – Persulfato de amónio, do inglês *Ammonium Persulphate*

Bis – Bisacrilamida

PVDF – Fluoreto de polivinilideno, do inglês *Polyvinylidene fluoride or polyvinylidene difluoride*

AP – Fosfatase alcalina, do inglês *Alkaline phosphatase*

DTT – Ditioneitol

HPR – Peroxidase de rábano, do inglês *Horseradish peroxidase*

RAST – Teste radioalergoabsorvente, do inglês *Radioallergosorbent test*

MM – Massa molecular

LTP – Proteína transportadora de lípidos, do inglês *Lipid transfer proteins*

TLP – Proteína do tipo taumatina, do inglês *Thaumatococcus-like protein*

SEM – Microscopia eletrônica de varrimento, do inglês *Scanning electron microscopy*

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão, do inglês *Transmission electron microscopy*

VEP – Partículas de exaustão de veículos, do inglês *Vehicle emitted particles*

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic acid*

DNA – Ácido desoxiribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*

PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase chain reaction*

Efeitos de poluentes atmosféricos na alergenicidade do pólen de *Platanus hybrida*

Resumo

A incidência de doença alérgica respiratória e a gravidade dos sintomas são superiores em zonas poluídas. Neste trabalho pretendeu-se comparar a produção e alergenicidade do pólen de *Platanus hybrida* entre um ambiente urbano (Évora) e um rural (Herdade da Mitra).

O pólen foi colhido em árvores *P. hybrida* nas duas localidades. Foi avaliada a produção polínica, quantificado o alérgénio *major* Pla a 1 (por ELISA específico), e analisados os perfis em alérgénios (bandas IgE-reativas) por Western-blot, usando soros de indivíduos alérgicos a pólen de plátano.

A produção polínica média foi semelhante nos locais estudados, apresentado, porém, maior dispersão em Évora. O conteúdo polínico de Pla a 1 foi superior em Évora. A intensidade de seis bandas IgE-reativas (incluindo o Pla a 1), foi superior em pólen de Évora. Os resultados sugerem que fatores característicos do ambiente urbano afetam a produção polínica e outras características do pólen, aumentando a sua alergenicidade.

Palavras-chave: Alergia; pólen; poluição; alérgénio; *Platanus hybrida*

Effects of atmospheric pollutants on *Platanus hybrida* pollen allergenicity

Abstract

In polluted areas, the incidence of allergic respiratory disease is elevated and allergic symptoms aggravated. The aim of this work was to evaluate the effect of urban (Évora) over rural (Herdade da Mitra) environment on the pollen production and allergenicity of *Platanus hybrida*.

Pollen was harvested from *P. hybrida* trees in both locations. Pollen production was evaluated, *major* Pla a 1 allergen quantified (by specific ELISA), and *Western blot* was used to analyze the allergen (IgE reactive proteins) profiles, using sera from allergic individuals.

The average pollen production was similar between locations, but greater dispersion was found in Évora. Pollen Pla a 1 content was higher in Évora. The intensity of six IgE-reactive bands (including Pla a 1) was higher in pollen from Évora. The results suggest that the characteristic of an urban environment affects pollen production and favours an increased pollen allergenicity.

Key-words: Allergy; pollen; pollution; allergen; *Platanus hybrida*

Capítulo I:
INTRODUÇÃO



1.1. Poluentes atmosféricos e o tráfego automóvel

Existem estudos epidemiológicos que identificaram a exposição a emissões de tráfego como um dos principais fatores de poluição atmosférica, contribuindo para o desenvolvimento de doenças alérgicas (Schultz et al., 2017). O último relatório da Agência Europeia do Meio Ambiente refere que até 96% da população urbana da União Europeia está atualmente exposta a concentrações de partículas finas acima das diretrizes da Organização Mundial da Saúde, pelo que se pode dizer que todos os grupos etários são influenciados pela poluição atmosférica (Sénéchal et al., 2015; World Health Organization Regional Office for Europe - Copenhagen, 2000). O repentino aumento dos níveis de poluentes ambientais devido ao desenvolvimento industrial e ao tráfego de veículos urbanos afetou a qualidade do ar e, conseqüentemente, a gravidade e a mortalidade por doenças alérgicas (Zhang et al., 2015).

Atualmente, o ozono troposférico (O_3) é tido como um dos poluentes atmosféricos mais importantes do século XXI, e a sua concentração aumentada é um problema que se estende a nível internacional (World Health Organization Regional Office for Europe - Copenhagen, 2000). A nível do solo, o O_3 é formado principalmente por reações fotoquímicas, tendo como precursores óxidos de azoto (NO_x), monóxido de carbono (CO) e compostos orgânicos voláteis (Ribeiro et al., 2014).

As respostas imunes podem ser afetadas por poluentes do ar, incluindo partículas geradas por combustão, hidrocarbonetos semi-voláteis e gases de escape. Os componentes da poluição fotoquímica, dióxido de azoto (NO_2) e O_3 , induzem respostas inflamatórias das vias aéreas, promovem as respostas imediatas e tardias aos alérgenos e reduzem a resistência a infeções (Gruijthuijsen et al., 2006).

1.1.1. Gases e matéria particulada

Em vários estudos epidemiológicos foi demonstrado que a exposição de curto prazo a concentrações elevadas de poluentes do ar ambiente, incluindo misturas de matéria particulada (PM), nomeadamente partículas finas (PM 2,5 μm), pode agravar a asma pré-existente e desencadear pieira (Schultz et al., 2017). Além dos gases e partículas poluentes emitidos por atividades humanas, a atmosfera é o meio de circulação para uma grande variedade de partículas biogénicas, tais como bioaerossóis, que consistem em tipos muito diferentes de

partículas, como vírus, bactérias, fungos, fibras vegetais ou pólen, com uma distribuição amplamente aberta de dezenas de nanômetros a algumas centenas de micrómetros, partículas estas muito ativas para diversas e potenciais doenças (Sénéchal et al., 2015).

A poluição atmosférica está associada a muitos sinais de agravamento da asma, como o aumento da hiper-responsividade brônquica, aumento do uso de medicação e aumento de visitas a serviços de emergência e internamentos hospitalares. Os componentes mais abundantes da poluição do ar em áreas urbanas com altos níveis de tráfego de veículos são PM inalável, NO₂ e O₃. Os efeitos dos poluentes atmosféricos na função pulmonar dependem do tipo de poluente e da sua concentração ambiental, da duração da exposição e da ventilação total das pessoas expostas. Os aeroalergénios, como derivados de pólen e esporos de fungos na atmosfera externa, são capazes de induzir obstrução brônquica em indivíduos predispostos, e a alergia ao pólen é amplamente usada para estudar a inter-relação entre poluição do ar e alergia respiratória em indivíduos atópicos. Os grãos de pólen transportados pelo ar, pequenos pedaços e restos de plantas de tamanho muito diminuto e grãos de pólen rompidos durante tempestades podem causar sintomas respiratórios alérgicos em indivíduos predispostos, interagindo também com outros contaminantes aéreos na produção desses efeitos (D'Amato, 2011)

O O₃ é originado a nível do solo por reações fotoquímicas que envolvem radiações ultravioletas nas misturas atmosféricas de NO₂ e hidrocarbonetos decorrentes das emissões dos veículos. Cerca de 40-60% de O₃ inalado é absorvido nas vias aéreas nasais, enquanto o restante atinge as vias aéreas inferiores e pode afetar o trato respiratório superior e inferior. A inalação de altas concentrações de O₃ induz a deterioração da função pulmonar e o aumento da reatividade das vias aéreas a agentes broncoconstritores inespecíficos e específicos e está relacionada com um risco aumentado de agravamento de asma em pacientes asmáticos. O aumento da concentração atmosférica de O₃ e NO₂ tem sido associado a aumentos na morbidade respiratória e nos internamentos hospitalares por asma em crianças e adultos.

O NO₂ é um precursor da poluição fotoquímica, é encontrado no ar em regiões urbanas e industriais e, em conjunto com a luz solar e hidrocarbonetos, resulta na produção de O₃. Os gases de escape de automóveis são a fonte mais significativa de NO₂ externo, embora algumas fontes que queimam combustíveis fósseis também o libertem no meio ambiente.

A PM é o problema mais grave de poluição atmosférica em muitas cidades e vilas, e parece ser o componente da poluição do ar mais consistentemente associado a efeitos adversos à saúde. É uma mistura de partículas sólidas e líquidas de natureza, tamanho e composição diferentes, entre as quais grãos de pólen e outras partículas vegetais que transportam alérgenos e esporos de fungos. A PM inalável pode alcançar as vias aéreas inferiores e é medido como PM₁₀ (menos de 10 µm de diâmetro aerodinâmico) e PM_{2,5} (menos de 2,5 µm).

Existe um aumento da produção de CO₂ com as mudanças climáticas, a urbanização e os altos níveis de emissões de veículos, juntamente com ao aumento da alergia respiratória na maioria dos países industrializados. As pessoas que vivem em áreas urbanas tendem a ser mais afetadas pela doença do que aquelas que vivem em áreas rurais (D'Amato, 2011).

A Directiva 2008/50/ce do Parlamento Europeu e do Conselho referem que “para garantir que as informações recolhidas sobre a poluição atmosférica sejam suficientemente representativas e comparáveis em toda a Comunidade, é importante utilizar, para avaliar a qualidade do ar ambiente, técnicas de medição normalizadas e critérios comuns no que diz respeito ao número e à localização das estações de medição”. As partículas finas em suspensão (PM_{2,5}) têm um impacto negativo importante na saúde humana, e ainda não foi definido um limiar abaixo do qual as PM_{2,5} seriam inofensivas, pelo que este poluente não deverá ser regulamentado da mesma forma que outros poluentes atmosféricos. Para o ozono (O₃) o limiar de informação é 180 µg/m³, para uma média de 1 h, e o limiar de alerta é de 240 µg/m³, para uma média de 1 h. O valor limite de dióxido de azoto (NO₂) é de 200 µg/m³, para uma média de 1 h. O valor limite de PM₁₀, num dia, é de 50 µg/m³, e os limiares superiores e inferiores de PM_{2,5}, numa média anual, são de 17 µg/m³ e 12 µg/m³, respetivamente (O Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, 2008).

1.1.2. Zonas urbanas vs. Zonas rurais

Atualmente, os recursos naturais têm um papel fundamental na regulação do stress da vida quotidiana, e têm sido vastamente cultivados espaços verdes. No entanto, apesar das diversas vantagens para a saúde pública, surgiram alguns problemas, sendo a questão mais séria a tendência crescente de sensibilização ao pólen, especialmente em ambientes urbanos. De facto, as pessoas que vivem em zonas de maior tráfego, são afetadas com alergias respiratórias induzidas por pólen mais do que aquelas em zonas rurais (Bosch-Cano et al.,

2011; Cariñanos & Casares-Porcel, 2011; D'Amato et al., 2010; Resnik, 2012; Sedghy et al., 2018).

Pode dizer-se também que a exposição à poluição do ar aumenta a resposta das vias aéreas a alérgenos inalados em indivíduos suscetíveis. Na maioria dos países industrializados, as pessoas que vivem em áreas urbanas tendem a ser mais afetadas por doenças respiratórias alérgicas do que aquelas nas áreas rurais (D'Amato, 2011).

Nas últimas décadas, existe um crescente número de evidências que aponta para uma associação entre a urbanização e a tendência crescente de doenças alérgicas, sugerindo a poluição do ar como uma das principais causas. Estudos mostraram que pessoas que vivem em áreas urbanas têm sintomas alérgicos mais graves e prevalentes do que aqueles em áreas rurais (Sedghy et al., 2018).

1.2. Efeito de poluentes no pólen

Bosch-Cano et al. (2011) mostraram que os poluentes do ar podem induzir uma grande quantidade de pólen alergénico em algumas árvores ornamentais, fornecendo novas fontes para aeroalergénios. Num outro estudo, Lu et al., 2014 mostraram que gases poluentes podem ser encontrados na superfície do pólen, aumentando a alergenicidade e libertação de proteínas alergénicas no pólen oriental (Sedghy et al., 2017).

Existem vários efeitos diretos no pólen, provocados por poluentes atmosféricos: modificações de funções biológicas e de reprodução, diminuição da viabilidade e germinação, alteração das características físico-químicas da superfície do pólen, alteração do potencial alergénico e efeito adjuvante, aumentando seus potenciais riscos para a saúde (Sénéchal et al., 2015).

Para investigar experimentalmente esses efeitos e, dependendo dos objetivos científicos, o pólen pode ser fumigado em instalações de laboratório com poluentes gerados artificialmente ou diretamente exposto à poluição atmosférica ao ar livre. Em casos em que o pólen utilizado é exposto à poluição atmosférica em ar livre, é necessário ter em conta dois grupos principais de ensaios de campo em material polínico poluído: Exposição passiva, em que o pólen e partículas nos grãos de pólen são colhidas no local de exposição; Método de

transplante, em que algum pólen previamente colhido é exposto em diferentes zonas poluídas, dentro de um período especificado.

A exposição passiva tem como principal vantagem fornecer um padrão de poluição realista e integrar os efeitos a curto e longo prazo dos poluentes nas plantas. Quando o pólen é colhido, tendo em conta os grãos de pólen total, o método mais comum é o esquema de comparação em que o material a ser estudado é colhido numa zona poluída (centro da cidade e nas margens da estrada) e numa zona de controlo (numa zona rural ou montanhosa) (Sénéchal et al., 2015). Para o caso de *P. hybrida*, apenas são conhecidos artigos onde o pólen foi fumigado, em laboratório, e um artigo em que se comparam zonas poluídas e zonas não poluídas (Lu et al., 2014; Ribeiro et al., 2014; Sedghy et al., 2017).

1.2.1. Efeito sobre as funções biológicas e reprodução

Foram realizados vários estudos, principalmente entre o final da década de 1960 e de 1980, sobre os efeitos das chuvas ácidas em diferentes pólenes de árvores das florestas europeias e americanas, com o objetivo de conhecer mais sobre a germinação e viabilidade do pólen sob condições de poluição, estando a saúde da floresta e a sua reprodução no âmbito das investigações (Sénéchal et al., 2015). Mesmo se orientadas para a floresta e/ou para área agro-, estas formas de investigação, ainda ativas, fornecem elementos que podem ajudar a entender melhor as alterações no conteúdo do pólen e também podem estar nas proteínas mais significativas envolvidas nessas alterações de viabilidade, algumas das que pode estar implicado em doenças alérgicas (Gottardini et. al., 2008).

Em experiências de pólen com o método de transplante, os testes de viabilidade e germinação realizados a pólen de *Betula verrucosa* e de *Dactylis glomerata*, após 2 dias completos de exposição em zonas industriais e de tráfego intenso, mostraram claramente que o material recém-colhido do pólen perdeu totalmente as suas funções biológicas e de reprodução. Tem sido observada uma diminuição na viabilidade e/ou germinação consistentemente para o pólen de várias espécies exposto naturalmente a ar poluído (Sénéchal et al., 2015).

Atualmente, ainda não é compreendido se a germinação e a alergenicidade dos grãos de pólen estão correlacionadas. No entanto, por exemplo, para o pólen de gramíneas, algumas

proteínas como os alergénios de pólen de gramíneas do grupo 1 (β -expansina) desempenham um papel importante no processo de reprodução. O Zea m 1 tem de facto um grande efeito nas taxas de crescimento do tubo polínico *in vivo*. Sabe-se também que a formação de espécies reativas de oxigénio no pólen começa no estágio inicial da germinação, antes da formação do tubo polínico, pelo que a germinação, a viabilidade do pólen, a alergenicidade e os efeitos da poluição do ar no pólen podem ter alguns pontos em comum de interesse (Sénéchal et al., 2015).

1.2.2. Efeitos físico-químicos

Os efeitos físico-químicos de poluição atmosférica no pólen que têm sido demonstrados ocorrem na superfície externa da exina, na superfície externa dos grãos, tanto no pólen colhido como também no pólen exposto. Estes efeitos são detetados através do uso de microscopia ótica, bem como por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e microscopia eletrónica de transmissão (TEM). Os resultados que mais se salientam em muitas das experiências efetuadas, mostram que a exposição à poluição do ar ambiente amplifica a fragilidade da exina, já por si bastante frágil, causando o colapso e abundantes fissuras na sua superfície (Duhoux, 1982). Em relação à matéria particulada presente no ar, a equipa de Chehregani e Majd mostrou que grande parte da PM pode acumular-se na superfície de grãos de pólen e alterar a forma e o tectum do pólen (Chehregani et al., 2004; Majd et al., 2004; Sénéchal et al., 2015).

Podem ocorrer ainda alterações químicas de proteínas, tais como as nitrações. Durante a permanência na atmosfera, os pólenes contactam com gases e material particulado aí existente, podendo ocorrer modificações químicas, de superfície, e bioquímicas, já que o pólen é um material biológico adaptável. Quando essas alterações se traduzem em modificações proteicas, quer nos níveis de expressão, quer pós-traducionais (como nitrações), a capacidade alergizante do pólen pode agravar-se. O efeito de NO₂ está descrito, em pólen de bétula induz nitração de uma proteína específica, reconhecida pelos indivíduos sensíveis como um alergénio (Bet v 1), agravando a sintomatologia (Gruijthuijsen et al., 2006). Um estudo em pólen de *Platanus orientalis* exposto a poluentes atmosféricos e a produtos de queima de combustíveis, revelou um aumento da expressão da proteína identificada como Pla a 1, o alergénio major desta espécie (Lu et al., 2014). Dados recentes no nosso laboratório mostram

também que a exposição do pólen de *Dactylis glomerata* a O₃ e a NO₂ modificam a superóxido dismutase, que está também documentada como um alergénio (Butteroni et al., 2005; Conti et al., 2014; Costa et al., 2017).

1.2.3. Alterações proteicas motivadas pelos poluentes atmosféricos

As diferentes modificações induzidas pela poluição do ar têm sido avaliadas no nível das proteínas. Os poluentes podem desempenhar um papel na variação da quantidade de proteínas e/ou na presença ou ausência de bandas de proteínas a partir de extratos comparativos. Por exemplo, Shahali et al. (2009) encontraram uma diminuição na quantidade total de proteína no pólen de *Cupressus arizonica* dos locais poluídos e uma diminuição de Cup a 1. Num estudo sobre pólen rural *versus* urbano, Guedes et al. (2009) observaram diferenças nos perfis de proteínas, uma vez que as bandas de 16 e 36 kDa (do extrato de pólen solúvel em água de *Chenopodium album*) desapareceram no pólen coletado na área mais poluída. A equipa de Majd et al. (2004) também observou o mesmo desaparecimento de algumas bandas proteicas ao comparar o pólen de zonas poluídas e não poluídas em pólen de diferentes espécies vegetais (Sénéchal et al., 2015).

Como referido anteriormente, foi ainda demonstrado que os gases NO₂ e O₃, em ambiente urbano poluído, também poderão modificar quimicamente proteínas transportadas pelo ar. Sob condições de poluição urbana, foi observada a nitração *in situ* de resíduos de tirosina de várias proteínas, incluindo o principal alergénio do pólen de bétula Bet v 1a. Além disso, foram também detetadas proteínas nitradas em amostras de poeira de vários ambientes urbanos. *In vitro*, a taxa de nitração de proteínas depende da abundância de óxidos de nitrogénio e ozono nas misturas de ar (Gruijthuijsen et al., 2006).

1.2.4. Alteração de composição de alergénios

Relativamente às proteínas específicas, os alergénios, e às modificações induzidas pela poluição do ar no pólen colhido ou exposto, bem como no material oriundo do pólen, os resultados não são concordantes. Alguns estudos, tal como o desenvolvido na Finlândia, não detetaram diferenças na alergenicidade do pólen de bétula de acordo com o gradiente de

poluição estudado, indicando que a poluição combinada de dióxido de enxofre e metais pesados não afeta os alérgenos do pólen (Helander et al., 1997).

Recentemente, na ZAUM (Munique), a equipe de Traidl-Hoffmann encontrou um aumento no conteúdo de alergénios nos extratos de pólen de bétula poluídos ao comparar o pólen de árvores com baixa exposição a O₃ e alta com exposição ao O₃ (Gilles et al., 2012).

Em cidades do Mediterrâneo e adjacentes, alguns alergénios como o Cup a 3 são expressos principalmente no pólen de cipreste em condição de stress, como é o caso da poluição atmosférica, devido a tráfego intenso. Por outro lado, em pólen de jardim, com baixa poluição, essa proteína não foi expressa (Cortegano et al., 2004; Suárez-Cervera et al., 2008).

Ao comparar extratos de pólen de *Lolium perenne* de zonas urbanas poluídas com zonas rurais não poluídas, Armentia et al. (2002) mostraram uma diferença significativa na reatividade cutânea dos 20 pacientes urbanos e 20 rurais testados aos extratos, com uma maior resposta relativamente ao pólen urbano, sendo que a maior concentração de Lol p 5 foi detetada nos extratos de pólen urbano (Sénéchal et al., 2015).

As diferenças nos tipos polínicos e nas características da exposição destes a poluentes podem estar na base nas diferenças encontradas entre estudos.

1.2.5. Partículas subpolínicas

A presença de partículas subpolínicas, inatas e emitidas a partir de grãos de pólen fragmentados, é atestada há muito tempo. De espécie para espécie, essas partículas não são de tamanho homogéneo nem da mesma natureza. A sua presença na atmosfera aumenta a biodisponibilidade dos alergénios do pólen. O papel da poluição na libertação e disseminação desses materiais está documentado. Relativamente aos efeitos dos poluentes na alergenicidade desse material aéreo específico, os resultados são escassos, ainda que hajam vários grupos a estudar intensivamente na última década (Sénéchal et al., 2015).

1.3. Efeito alergénico da combinação de poluentes atmosféricos e material biológico derivado do pólen

É possível que os poluentes do ar promovam a sensibilização das vias aéreas, induzindo alterações no conteúdo alergénico de partículas transportadas pelo ar que transportam alergénios. Há também evidências de que o dano na mucosa das vias aéreas e o comprometimento da depuração mucociliar, induzido pela poluição do ar, podem facilitar a penetração e o acesso dos alergénios inalados às células do sistema imunológico. No entanto, os pacientes afetados pela asma frequentemente experimentam rinite e, portanto, respiram pela boca, ignorando a função nasal e facilitando a penetração de poluentes e aeroalergénios nas vias aéreas inferiores (D'Amato, 2011).

Há vários anos que se coloca a hipótese de que o O₃ e outros poluentes podem aumentar a suscetibilidade de indivíduos alérgicos a antigénios aos quais são sensibilizados, e existem estudos que o comprovam. Foi relatado que o O₃ está associado a um risco aumentado de desenvolvimento de asma entre crianças na Califórnia que praticam atividades desportivas ao ar livre. Assim, a poluição do ar e o exercício ao ar livre podem contribuir para o desenvolvimento de asma em crianças, aumentando a inflamação das vias aéreas e a capacidade de resposta das vias aéreas. (D'Amato, 2011)

Existe ainda um estudo da maior e mais catastrófica epidemia de asma provocada por trovoadas, na Austrália, a 21 de novembro de 2016, precipitando vários milhares de apresentações respiratórias agudas nas emergências, e associada a dez mortes. A asma por trovoadas é o desencadeamento de um ataque de asma por condições ambientais causadas por uma tempestade local. A investigação destes eventos sugere que os eventos de asma por trovoadas resultam de uma complexa interação de fatores de suscetibilidade ambientais e individuais. Os fatores ambientais estabelecidos incluem altas concentrações de um aeroalergénio, chuva e humidade para romper os grãos de pólen, libertando grãos finos respiráveis para as vias aéreas inferiores, e tempestades que levam partículas de alergénios respiráveis ao nível do solo. Os fatores individuais de suscetibilidade incluem a sensibilização prévia a aeroalergénios sazonais, rinite alérgica sazonal e baixas taxas de uso de corticosteróides inalatórios em pacientes com diagnóstico de asma. Podem haver fatores desencadeantes ambientais e meteorológicos, risco e suscetibilidade da população, efeitos nos serviços de saúde e estratégias de mitigação relacionados com as epidemias de asma que

podem ocorrer. Os grãos de pólen podem ser transportados por tempestades ao nível do solo, com a libertação de aerossóis biológicos alergénicos de tamanho paucimicrónico, oriundos do citoplasma de pólenes rompidos ou não, que podem penetrar profundamente nas vias aéreas inferiores. No caso deste evento, o papel da mudança climática deve ser tido em conta, por exemplo, o aumento das concentrações atmosféricas de dióxido de carbono e temperaturas que afetam as concentrações de aeroalergénios (Albertine et al., 2014; J. Hunter et al., 2017). Também é sugerido que a mudança climática possa estender as épocas polínicas em todo o mundo, com uma maior probabilidade, crescente, de eventos climáticos extremos como tempestades, cuja confluência pode aumentar o risco de eventos mais frequentes de asma epidémica no futuro. Outras grandes cidades, que partilham combinações semelhantes de condições ambientais podem não estar igualmente preparadas, estando vulneráveis a essa epidemia (D'Amato et al., 2016; Thien et al., 2018).

1.4. *Platanus hybrida*

1.4.1. Caracterização da espécie

A espécie *Platanus hybrida* é da família *Platanaceae* e tem como nome comum “Plátano”. É uma planta arbórea, utilizada como árvore de sombra ornamental, frequentemente em parques, praças, jardins, passeios, ruas, margens de estradas e de cursos de água. Está muito presente em zonas populacionais, quer em meio urbano, quer em meio rural.

É uma árvore que aprecia a luz e requer solos ligeiros, férteis, profundos (dá-se mal em solos superficiais) que são necessários ao seu sistema radicular, para se desenvolver de forma conveniente, e solos com certa humidade. É resistente ao ataque de insetos e suporta bem o ambiente mais poluído das cidades. Como árvore ornamental alcança os 1500 m de altitude. É uma árvore de porte vigoroso, que pode alcançar mais de 30 m de altura. A copa é oval na idade juvenil, tendendo a arredondar ao longo do tempo. O tronco é de cor acinzentada, reto e grosso, distinguindo-se pela sua casca, que se desprende em grandes placas, de forma irregular. Há citações atuais de árvores que registam idades de até 400 anos, com um perímetro de 11 m. Embora frutifique abundantemente, as sementes não são com frequência, férteis [1]. Esta árvore é de folha caduca, inflorescências desenvolvem-se no início da primavera e a polinização é anemófila. Antes da floração ser iniciada, ocorrem duas fases: *budburst* I, onde

os rebentos ficam inchados, e o *budburst* II, onde os rebentos começam realmente a abrir. De seguida ocorrem as etapas da floração, que ocorre em duas fases: a fase I da floração, em que os rebentos estão agora abertos e as flores são visíveis, e a fase II da floração, onde as flores estão abertas (Mimet et al., 2009).

A espécie *Platanus hybrida* tem grande representatividade na cidade de Évora (Galveias et al., 2016) e meios rurais próximos, e o seu pólen está descrito como alergénico (A. Asturias et al., 2003), tendo sido por estas razões escolhido como modelo biológico deste estudo.

1.4.2. O pólen de *Platanus hybrida*

Na região de Évora, a época polínica de *P. hybrida* é entre março e abril, e a espécie tem o seu período de floração em março, com polinização anemófila. O seu pólen tem de diâmetro 16-20 μm , uma forma circular e/ou triangular (Figura 1), com aberturas tricolpadas de colpos curtos e arredondados [2 & 3].

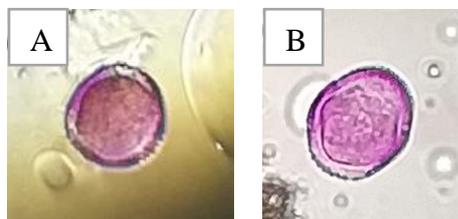


Figura 1: Pólen de *P. hybrida* observado em microscópio ótico, na ampliação de 400x. Em **A** observa-se a vista frontal do pólen e em **B** a vista lateral.

Em Évora, observam-se valores elevados de diversos tipos polínicos (Figura 2), embora sejam os da família das gramíneas, da oliveira e da urtiga, os que mais se destacam pelos valores percentuais anuais que atingem. O pólen de plátano contribui em 3% para o total anual (Todo-Bom et al., 2004). Contudo, uma baixa percentagem anual não significa uma baixa exposição a este tipo polínico. Como o período de polinização do *P. hybrida* é relativamente curto (20-45 dias), os níveis de pólen atmosférico desta espécie no seu período de polinização são consideráveis, podendo atingir 2×10^3 grãos de pólen/ m^3 de ar [3].

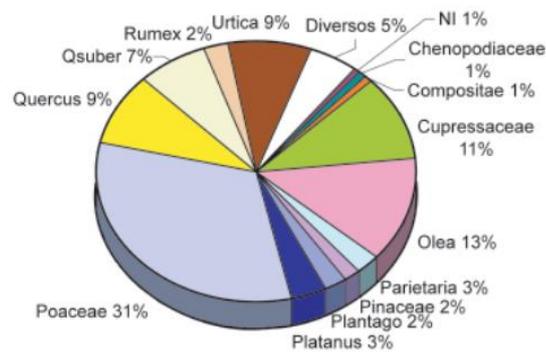


Figura 2: Índices percentuais anuais de pólen das famílias polínicas mais relevantes em Évora (retirado de Todo-Bom et al., 2004).

Nos meses de Inverno, em janeiro e fevereiro, observam-se contagens muito altas de *Cupressaceae* e de *Urtica*. A partir de março, durante toda a primavera, observam-se contagens elevadas de *Platanus*, *Quercus*, *Pinus*, *Parietaria*, *Poaceae*, *Olea*, *Plantago* e *Compositae*. A existência de altos níveis de incidência aeropalinológica entre março e julho tem como consequência o facto de, mesmo espécies em que os valores percentuais parecem modestos, poderem representar significância clínica importante (Todo-Bom et al., 2004).

O pólen de *P. hybrida* tem cinco alergénios conhecidos, nomeadamente o Pla a 1, Pla a 2, Pla a 3, Pla a 8, Pla a TLP, todos com via de exposição por inalação [4].

O **Pla a 1** é designado o alergénio *major* de *P. hybrida* e é uma proteína com função provável de inibidor de invertase, com massa molecular 18 kDa. Estudos de localização intracelular mostram que, após 5 min em meio de germinação, este alergénio é detetado como proteína solúvel e libertado das regiões de abertura e não-abertura da parede celular de grãos de pólen. Em grãos maduros de pólen não hidratado, são predominantemente associados às cisternas concêntricas do retículo endoplasmático. Após 5, 15 e 30 min, e 2 h de hidratação, a localização nessa região de retículo endoplasmático é bastante diminuída (Suárez-Cervera et al., 2005). Esta proteína tem duas ligações dissulfureto, entre os resíduos 31 e 46 e 102 e 142. O péptido tem 179 resíduos de aminoácidos e um peptídeo sinal nas posições 1 e 23, do terminal amina (A. Asturias et al., 2002; A. Asturias et al., 2003). Este péptido é também expresso no caule, mas não nas folhas [5].

O **Pla a 2** é uma proteína com função de exo-poligalacturonase com atividade catalítica, de massa molecular 43 kDa. Atua na organização da parede celular, processo catabólico de pectina, desenvolvimento de pólen, germinação de pólen e desenvolvimento do tubo polínico. Tem pH ótimo a 4.0, temperatura ótima a 50 °C. A cadeia polipeptídica tem 377 resíduos de aminoácidos e peptídeo sinal nos resíduos de 1 a 5. Ocorrem glicosilações nas posições 211 e 345. Tem dois centros ativos, na posição 200, sendo de doador de protões, e na posição 223. Tem atividade 1-4- α -galacturonidase, e atividade de poligalacturonidase. Tem função molecular de glicosidase e hidrolase. Esta proteína é segregada. Assim, pode ser detetada, em estudos de localização intra-celular, no exterior da parede celular, no retículo endoplasmático, parede celular, complexo de Golgi e vesículas endoplasmáticas (Asturias et al., 2006; Suárez-Cervera et al., 2005). Após 5 min em meio de germinação, é detetado como uma proteína solúvel e libertada nas regiões de abertura e não abertura da parede de grãos de pólen; após 15 e 30 min, é abundante na abertura germinativa; após 2 h em meio de germinação, a localização nessas regiões diminui (Suárez-Cervera et al., 2005). Em grãos de pólen maduros e não hidratados, é abundante em cisternas e vesículas de Golgi na região da abertura; após 5 minutos de hidratação, a localização nessas regiões diminui; após 15 minutos de hidratação, está presente em volta do tubo polínico emergente e no centro da célula vegetativa, tanto no retículo endoplasmático como no complexo de Golgi; após 30 min de hidratação, está presente na junção entre a parede e o tubo polínico (Suárez-Cervera et al., 2005). É expresso no pólen, nos caules mas não nas folhas (Ibarrola et al., 2004; [5]).

O **Pla a 3** é uma proteína de transferência lipídica não específica (LTP), pelo que é responsável por ligação e transporte de lípidos. As proteínas inespecíficas de transferência de lípidos das plantas transferem fosfolípidos e galactolípidos, através das membranas. Tem uma massa molecular de 10 kDa, e pode desempenhar um papel na deposição de cera ou cutina nas paredes celulares das células epidérmicas em expansão e de certos tecidos secretores. Tem cadeia polipeptídica com 118 resíduos de aminoácidos e peptídeosinal nas posições de 1 a 26. [4]

O **Pla a 8**, ou profilina, tem a função biológica de proteína de ligação à actina e a sua massa molecular é de 15 kDa. Está presente no pólen e a sua exposição ocorre por inalação [5]. As profilinas representam um grupo de proteínas envolvidas na polimerização de actina no citoesqueleto do microtúbulo, além de desempenhar outros papéis, como sinalização. No entanto, sua função quando libertada no estigma é desconhecida (Burks et al., 2019).

O **Pla a TLP**, “Thaumatin-like Protein”, ou taumatina, tem massa molecular de 25 kDa, está presente no pólen e a sua exposição ocorre por inalação [5]. As TLP são polipeptídeos de cerca de 200 resíduos de aminoácidos que compartilham semelhança de sequência com a taumatina (Liu et al., 2010).

1.4.3. Efeito de poluentes ambientais no pólen de *P. hybrida*

Os artigos de Lu et al. (2014), Ribeiro et al. (2014), Sedghy et al. (2017) apresentam trabalhos em que são usadas espécies de estudo do género *Platanus*, relacionando características do pólen destas espécies com poluentes atmosféricos, os dois primeiros com exposição “*in vitro*” do pólen a poluente, e o terceiro com exposição passiva ambiental.

O estudo de Lu et al. (2014) utiliza *Platanus orientalis* como espécie de estudo, e para verificar se o pólen de *Platanus* e poluentes atmosféricos têm um efeito sinérgico, colheram grãos de pólen, que expuseram a poluentes aéreos gasosos de ambiente urbano, incluindo SO₂, NO₂ e NH₃ (durante 1h ou 8h), bem como a partículas de exaustão de veículos (VEPs) (durante 8h). Os grãos de pólen foram colocados em um filtro de membrana de policarbonato e expostos numa câmara de ambiente controlado aos gases SO₂ (0,1 L/min), NO₂ (0,54 L/min) e NH₃ (0,03 L/min), sendo a humidade mantida a 60% e a temperatura a 25 °C, condição semelhante aos valores da época polínica. O pólen foi analisado por SEM, as proteínas foram extraídas e determinada a sua concentração pelo método de Bradford e, posteriormente, as proteínas extraídas foram separadas por SDS-PAGE. Foi também realizada eletroforese bi-dimensional para análise da expressão proteica e espectrometria de massa para identificação de proteína de *Platanus*. Os resultados de exposição mostraram que os grãos de pólen ficam inchados e que podem ser encontradas novas partículas na superfície do pólen após a exposição à mistura de gases, e que a mudança morfológica do pólen ambiental pode afetar o comportamento de seu conteúdo alergénico. Foi também detetada uma nova banda de proteínas, com massa molecular aproximada de 26,5 kDa, após exposição do pólen de *Platanus* aos VEPs em estudo. Estes resultados sugerem que os poluentes atmosféricos podem afetar a libertação de alergénios do pólen de *Platanus*. Mostraram ainda que a expressão de uma proteína alergénica (Pla a 1) do pólen de *P. orientalis* é aumentada após a exposição a gases poluentes e VEPs.

O trabalho de Ribeiro et al. (2014) *Platanus acerifolia*, com o objetivo de investigar os efeitos do O₃ no conteúdo proteico e perfis proteicos de ligação a IgE do pólen destas espécies, após exposição *in vitro* a diferentes níveis de concentração do gás. As inflorescências foram colhidas durante o período de floração na cidade, e as anteras foram secas e esmagadas até o pólen puro passar entre vários níveis de peneiras. O pólen foi exposto a O₃ numa câmara ambiental equipada com um Simulador Solar, uma ventoinha para homogeneizar o ar, e sensores de humidade e temperatura. As amostras de pólen foram expostas a O₃ individualmente, durante 6 h, em concentrações crescentes de metade, igual e quatro vezes superior ao valor limite para a proteção da saúde humana. A proteína nos extratos polínicos foi extraída e o conteúdo proteico solúvel dos extratos foi quantificado através do método de Bradford. Foram separadas as proteínas dos extratos proteicos e realizado *immunoblot*. Foram selecionados 10 pacientes atópicos, poli-sensibilizados ao pólen desta espécie, avaliados pela resposta positiva do teste cutâneo Prick, e cada soro foi aplicado individualmente. Observaram que o tratamento com O₃ induziu uma diminuição de concentração proteica nos extratos, independentemente da concentração de gás testada. Relativamente ao *immunoblot*, nos extratos de *Platanus*, na maior parte dos soros testados, foi observada uma diminuição na reatividade da IgE com o aumento da exposição à concentração de O₃.

No estudo de Sedghy et al. (2017), foi utilizado pólen de *Platanus orientalis* e foram efetuadas colheitas de pólen em 3 zonas poluídas e em 2 zonas não poluídas. Foi estabelecido um critério de poluição tendo em conta a densidade populacional e o número de veículos. Nas zonas poluídas, as colheitas de pólen foram efetuadas num raio de 10 m de vias de circulação, e nas zonas não poluídas as colheitas foram feitas a 500 m das zonas de tráfego. O pólen colhido foi observado por SEM, foram preparados extratos proteicos, quantificada a proteína pelo método de Bradford e realizado SDS-PAGE e immunoblotting para avaliação da produção de proteínas a partir de extratos de pólen. Foi ainda realizada extração de RNA e síntese de cDNA e amplificação por PCR em tempo real de alergénios. Relativamente a resultados, não foram detetadas partículas submicrónicas, e após *immunoblot* é referido um aumento de Pla a 3 e de Pla a 1 nas zonas poluídas, confirmadas pela análise quantitativa ao mRNA

Estes estudos revelam a influência de poluentes ambientais na alergenicidade do pólen do género *Platanus*, mas também evidenciam a necessidade de estudar melhor esta interação.

Capítulo II:
OBJETIVOS



2.1. Objetivos

2.1.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi contribuir para esclarecer alguns efeitos da poluição atmosférica sobre a produção polínica e sobre a alergenicidade do pólen de *Platanus hybrida*. Para tal neste trabalho comparou-se um ambiente urbano (Évora) e um rural (Valverde – Herdade da Mitra).

2.1.2. Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar os níveis polínicos e do alergénio Pla a 1 em amostras de ar representativas da zona de Évora; para isso, realizaram-se as contagens polínicas de acordo com a metodologia padrão da REA e procedeu-se a captação de amostras de ar usando o equipamento ChemVol, e a sua extração e quantificação de alergénio *major* Pla a 1 por ELISA;
- ✓ Definir os locais de amostragem e caracterizá-los no que respeita a parâmetros indicadores da qualidade do ar; utilizaram-se neste caso metodologias de quantificação de poluentes atmosféricos, nomeadamente o uRAD monitor a3 e dados do satélite ESA Sentinel-5P;
- ✓ Avaliar a produção polínica de árvores *Platanus hybrida*, recorrendo a quantificação do número de grãos de pólen por antera, por microscopia ótica, nos dois locais de amostragem;
- ✓ Quantificar a proteína total e o alergénio *major* de *P. hybrida*, Pla a 1; procedeu-se assim, a preparação de extratos proteicos polínicos seguida da quantificação de proteína total, pelo método BCA, e do Pla a 1 por ELISA específico;
- ✓ Avaliar a imuno-reatividade dos extratos polínicos utilizando soros de indivíduos alérgicos a *P. hybrida*, por *immunoblotting*.

Capítulo III:
**MATERIAIS E
MÉTODOS**



3.1. Estratégia

3.1.1. Local de realização

Laboratório de Bioquímica Aplicada e Aerobiologia, Fase III, Colégio Luís António Verney, Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora.

3.1.2. Período de realização

Este trabalho foi realizado durante um ano letivo (2018/2019).

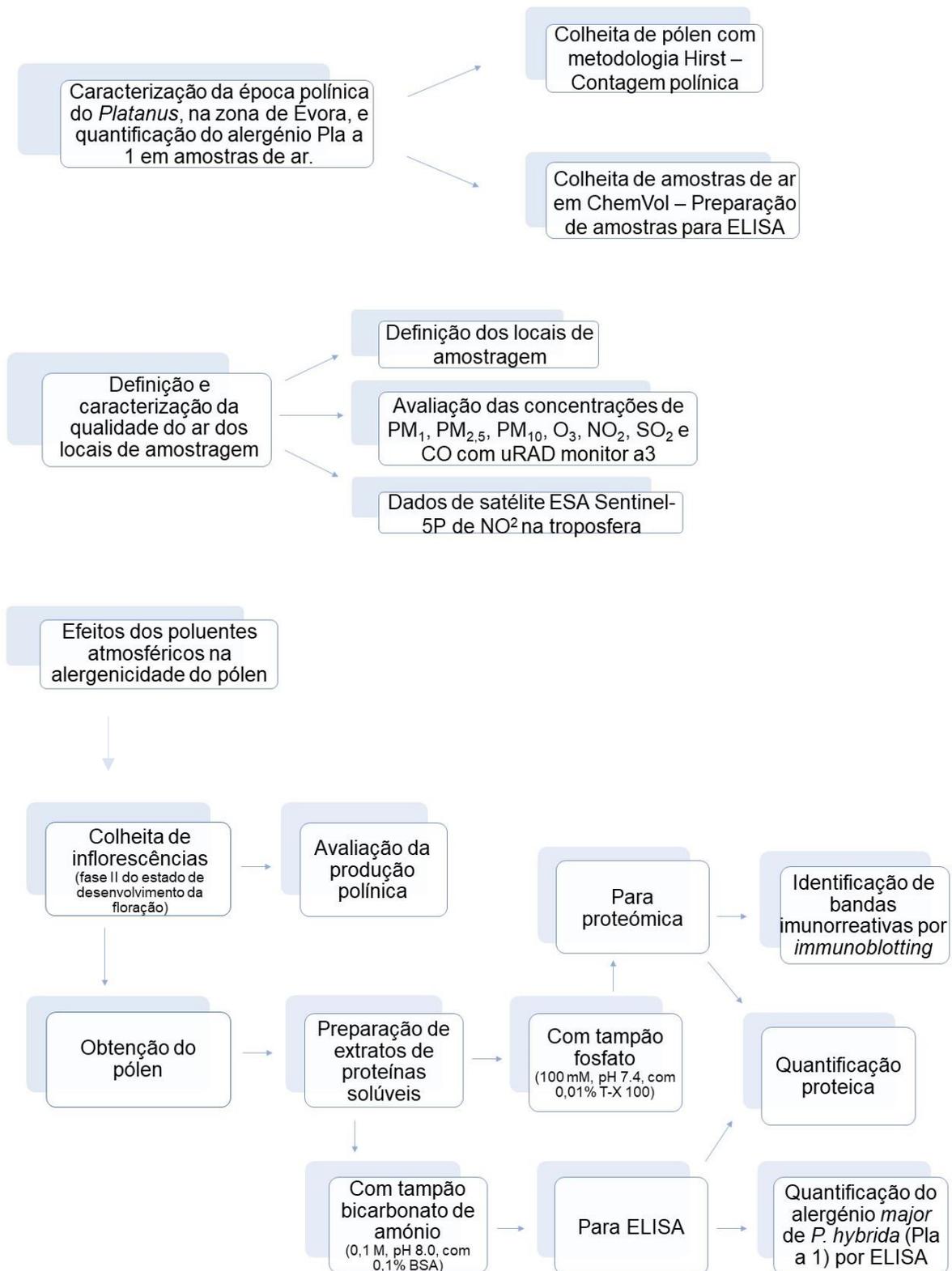
3.1.3. Amostras

- ✓ Soro de indivíduo com Prick e RAST positivos a *P. hybrida* e sintomatologia alérgica na época polínica desta espécie
- ✓ Soros de indivíduos com IgE negativa
- ✓ Extrato de *P. hybrida*

3.1.4. Técnicas utilizadas

- ✓ Captação de pólen
- ✓ Extração proteica
- ✓ Liofilização
- ✓ ELISA
- ✓ *Immunoblotting*

3.2. Esquema do procedimento experimental



3.3. Metodologia

3.3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados eram de grau de pureza elevado. A grande maioria foi adquirida à firma Sigma Aldrich, tirando indicação em contrário. Os anticorpos utilizados nos métodos de deteção imunológica serão indicados nos pontos 3.3.9 e 3.3.10 da Metodologia.

3.3.2. Definição dos locais de amostragem

Foram definidos dois locais de amostragem, numa zona urbana e numa zona rural, em Évora e em Valverde, mais precisamente na Herdade da Mitra, respetivamente. Na Figura 3 observa-se a localização geográfica dos locais de amostragem, respetivas imagens e coordenadas geográficas.

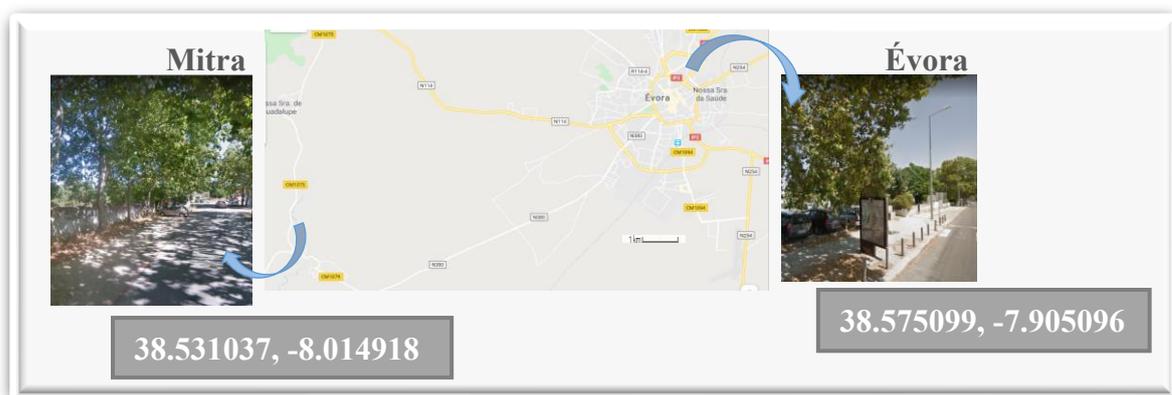


Figura 3: Locais de amostragem, respetivas imagens e coordenadas geográficas, retiradas de GoogleMaps.

O local de amostragem em ambiente urbano, em Évora, situa-se junto a uma via de grande afluxo, com coordenadas geográficas 38.575099, -7.905096, e o local de amostragem em ambiente rural situa-se a cerca de 12 km da cidade de Évora, na Herdade da Mitra, com coordenadas geográficas 38.575099, -7.905096, também junto a uma via de circulação.

3.3.3. Caracterização da qualidade do ar nos locais de amostragem

Na cidade de Évora, no local de amostragem definido anteriormente, foram efetuadas medições de poluentes atmosféricos com o equipamento *uRAD monitor a3*, com o qual se

avaliaram as concentrações de PM₁, PM_{2,5}, PM₁₀, O₃, NO₂, SO₂ e CO, em µg/m³. Estas medições foram efetuadas ao final da tarde, numa hora de maior afluxo de trânsito automóvel, entre as 17h10 e as 18h.

Uma avaria no equipamento *uRAD monitor a3* impossibilitou a sua utilização para a caracterização da qualidade do ar no local de amostragem da Mitra, pelo que recorremos a outra abordagem a fim de comparar os dois locais, usando dados de satélite. Assim, foram utilizados dados de uma coluna troposférica de NO₂ (da superfície a 10 km de altitude), em mol/m², sobre o concelho de Évora, obtida através do instrumento TROPOMI (TROPOspheric Monitoring Instrument) a bordo do satélite ESA Sentinel-5P. Os valores apresentados correspondem à média de 22 meses (01/01/2018 a 30/10/2019).

3.3.4. Colheita de amostras

A colheita das amostras de pólen, feita diretamente das árvores, foi realizada na cidade de Évora e no polo da Mitra, em localizações definidas e durante a respetiva época polínica de *P. hybrida* nos anos de 2018 e 2019. Das árvores foram recolhidas as estruturas com as anteras para envelopes, de modo a ser mais fácil recolher o pólen libertado. O conteúdo dos envelopes foi colocado numa peneira de 2 níveis, de modo a separar o pólen e constituintes de maior tamanho. O pólen obtido após a peneiração foi introduzido em tubos de 1,5 mL e guardados em exsiccador até posterior utilização.

Foram também colhidas 5 inflorescências, na fase II do estado de desenvolvimento da floração, por árvore, na cidade de Évora e no polo da Mitra, num total de 5 árvores por zona, antes do início da época polínica de 2019 para verificar o efeito da poluição na fisiologia e alergenicidade do pólen. As inflorescências foram guardadas até utilização.

3.3.5. Dados do índice polínico

Os grãos de pólen foram colhidos a partir de uma metodologia padrão Hirst (M. Hirst, 1945). O amostrador volumétrico aspira o ar numa taxa de 10L/min, e os grãos de pólen são retidos numa fita de Melinex revestido com silicone. A preparação de lâminas para a contagem e identificação dos tipos polínicos foi realizada a partir de uma metodologia padrão recomendada pela Rede Europeia de Aeroalergénios (EAN) e a Rede Espanhola de Aerobiologia (REA) (A. Smith et al., 2009; Galán et al., 2017). A contagem diária foi realizada

em 4 linhas horizontais numa ampliação de 400x, em microscópio ótico (Olympus) identificado na Figura 4, e os resultados foram expressos em pólen por metro cúbico de ar (pólen/m³) [6].



Figura 4: Microscópio ótico utilizado na identificação e quantificação de pólen.

Os dados de índice polínico dos anos 2018 e 2019 foram obtidos através da contagem polínica diárias, das 00h às 00h.

3.3.6. Avaliação de produção polínica

Os dados de produção polínica do ano de 2019 foram obtidos com auxílio de uma lupa binocular (Olympus), através da contagem de lâminas preparadas com grãos de pólen das inflorescências em fase II do estado de desenvolvimento da floração. Para tal, foram colhidas 3 anteras de cada inflorescência (Figura 5A) e colocadas em tubos de 1,5 mL. A cada tubo foram adicionados 600 μ L de etanol 70% de modo a fixar o material biológico.

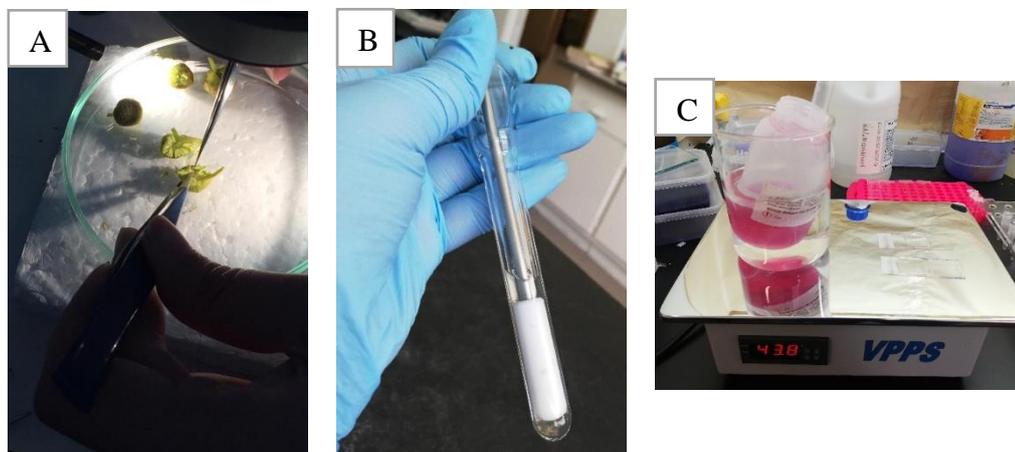


Figura 5: Processo da avaliação da produção polínica. Em **A** observa-se a colheita de anteras numa inflorescência, em **B** a maceração do preparado com anteras, e em **C** a preparação de lâminas para quantificação em microscópio ótico.

No passo seguinte, o preparado foi transferido para um tubo de vidro de 4 mL e macerado com um êmbolo (ThomasScientific) para que as anteras abram (Figura 5B). Posteriormente, o preparado foi novamente transferido para o tubo de 1,5 mL, perfazendo com etanol 70% até 1 mL, garantindo que as paredes do tubo de vidro não continham resquícios de pólen. A etapa seguinte foi a preparação das lâminas em placa de aquecimento, em triplicado, como demonstrado na Figura 5C. O conteúdo de cada tubo foi previamente homogeneizado, foi colocada uma gota de glicerogelatina com fucsina na respetiva lâmina, seguido da aplicação de 10 µL de amostra e colocação de lamela sobre a gota aplicada, tendo o cuidado de não deixar a amostra transbordar da lâmina. De seguida, observaram-se as lâminas em microscópio ótico, na ampliação 400x.

3.3.7. Preparação de extratos de proteínas solúveis

3.3.7.1. Para proteómica

Para preparação de extratos proteicos para uso em proteómica, colocaram-se 4 mg de pólen num tubo de 5 mL, colocou-se o tubo em nitrogénio líquido para congelar pólen e este ser mais facilmente quebrado, e macerou-se o pólen congelado com um pilão. Adicionou-se 50 µL de tampão fosfato 100 mM, pH 7.4, com 0,01% T-X 100, macerou-se novamente o preparado com o pilão e adicionou-se 50 µL do mesmo tampão fosfato. De seguida, o preparado foi exposto a ultrassons durante 5 min, e foi centrifugado a 10000 g durante 15 min. Transferiu-se o sobrenadante para tubos de 1 mL e guardaram-se sedimentos e alíquotas de sobrenadante, que se mantiveram a 4°C até análise.

3.3.7.2. Para ELISA

Foram preparados extratos de proteínas solúveis para quantificação do alergénio Pla a 1 por ELISA, tanto de amostras ar, obtidas com o equipamento ChemVol, representativas da região de Évora, como das amostras de pólen colhido nos locais de amostragem definidos.

Relativamente às amostras de ar, os filtros provenientes de captador ChemVol foram colocados em tubos de Falcon de 15 mL onde foram adicionados 15 mL de tampão bicarbonato de amónio 0,1 M, pH 8.0 suplementado com 0,1% BSA no caso de se tratar de filtros XL e adicionados 6 mL do mesmo tampão bicarbonato de amónio quando se trata de

filtros M. Os tubos foram colocados num agitador, e foram agitados por inversão durante 4 h protegidos da luz. Terminada esta etapa, colocou-se cada filtro dentro de uma ponta de pipeta p5000, para secar ao máximo a esponja, e colocaram-se os tubos em centrífuga refrigerada (Hermle Z323K) onde se centrifugou a 2000 rpm, 5 min a 4 °C. De seguida, os filtros foram retirados de dentro das pontas de pipeta e foram novamente centrifugados, juntamente com o sobrenadante, a 6000 rpm, 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido para tubos de liofilização de 5 mL (Eppendorf), sendo que o sobrenadante correspondente aos filtros XL foi guardado em 4 alíquotas de 2,5 mL e 2 alíquotas de 2 mL, e em relação aos filtros M foram preparadas 2 alíquotas de 2,5 mL. Foram adicionados 2 µL de BSA 10% a cada alíquota, exceto em duas alíquotas dos filtros XL que serviram como backup. Por fim, foi guardado o sedimento em tubos de 1 mL. O sobrenadante foi liofilizado em liofilizador (Figura 6) e guardado para uso posterior.



Figura 6: Liofilizador utilizado.

No caso das amostras de pólen colhidas no local de amostragem, colocaram-se 0.1 g de pólen num tubo de Falcon de 15 mL, adicionou-se 10 mL de solução tampão bicarbonato de amónio 0,1 M, pH 8.0 suplementado com 0,1% BSA e 15 µL de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PSFH) e 100 mM de isopropanol. Agitou-se durante 2 h, à temperatura ambiente, protegidos da luz. De seguida, centrifugou-se a mistura a 3000 g, durante 10 min. O sobrenadante foi guardado por alíquotas, em tubos de Falcon pesados previamente. Ao sedimento foi adicionado 5 mL de solução tampão bicarbonato de amónio 0,1 M, pH 8.0

suplementado com 0,1% BSA, colocado a agitar durante 2 h, à temperatura ambiente, isolados da luz. De seguida, centrifugou-se durante 10 min, e foi guardado o sobrenadante.

3.3.8. Quantificação proteica

A quantificação de proteína nos extratos foi realizada através do método de micro BCA (ácido bicinconínico). O método de BCA foi descrito primeiramente por Smith et al. (1985) e depende da conversão de Cu^{2+} em Cu^+ em condições alcalinas. O Cu^+ é então detetado através da reação com BCA. O ensaio tem sensibilidade semelhante ao do método de Lowry, mas sendo o BCA estável em condições alcalinas, este ensaio tem a vantagem de poder ser realizado como um processo de uma etapa. A reação resulta no desenvolvimento de uma cor púrpura intensa, como exemplificado na Figura 7, com uma absorvância máxima a 562 nm. Como a produção de Cu^+ neste ensaio é uma função da concentração de proteínas e do tempo de incubação, o teor de proteínas de amostras desconhecidas pode ser determinado espectrofotometricamente por comparação com padrões de proteínas conhecidos. Este ensaio não é afetado por uma variedade de detergentes e agentes desnaturantes, como ureia e cloreto de guanidina, embora seja mais sensível à presença de açúcares redutores (Walker & Walker, 2003).

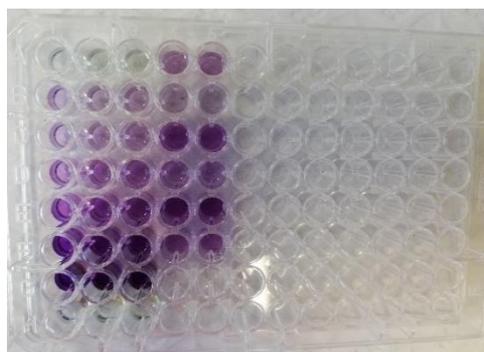


Figura 7: Quantificação de proteína. Exemplo de placa com curva padrão e amostras com reagente aplicado, para leitura de absorvância.

Para realizar a quantificação de proteína, foi utilizada uma placa de 96 poços onde foram aplicados 25 μL de padrão (ver em Anexos), branco e as amostras em estudo. De seguida o reagente foi preparado (Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific) e foram aplicados 100 μL por poço. A placa foi incubada a 37 °C durante 1h30, protegida da luz. A absorvância foi lida a 562 nm em espectrofotómetro.

3.3.9. Quantificação do alergénio major de *P. hybrida* (Pla a 1) por ELISA

A quantificação de Pla a 1 foi determinada por ELISA *sandwich* (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Os ELISAs são imunoensaios enzimáticos e podem ser executados com várias modificações no procedimento básico: direto, indireto, *sandwich* ou competitivo (Figura 8). A etapa chave, imobilização do antígeno de interesse, pode ser realizada por adsorção direta à placa de ensaio ou indiretamente através de um anticorpo de captura anexado à placa. O antígeno é então detetado diretamente (anticorpo primário marcado com enzima) ou indiretamente (anticorpo secundário marcado com enzima).

Após a fase sólida ser lavada, um anticorpo marcado com enzima (anticorpo de detecção) diferente do anticorpo de captura é adicionado e forma um “complexo sandwich” de fase sólida-anticorpo:antígeno:anticorpo-enzima. O excesso de anticorpo não ligado é lavado e é adicionado o substrato enzimático. O marcador enzimático catalisa a conversão do substrato a produto(s), a quantidade do qual é proporcional à quantidade de antígeno na amostra. Os anticorpos de detecção geralmente são marcados com fosfatase alcalina (AP) ou peroxidase de rábano silvestre (HRP). (A. Burtis, R. Ashwood, & E. Burns, 2008; [6])

No entanto, um antígeno é capturado na placa (por adsorção direta à superfície ou através de um anticorpo de "captura" pré-revestido, como num ELISA *sandwich*), é a etapa de detecção (direta ou indireta) que determina a sensibilidade de um ELISA.

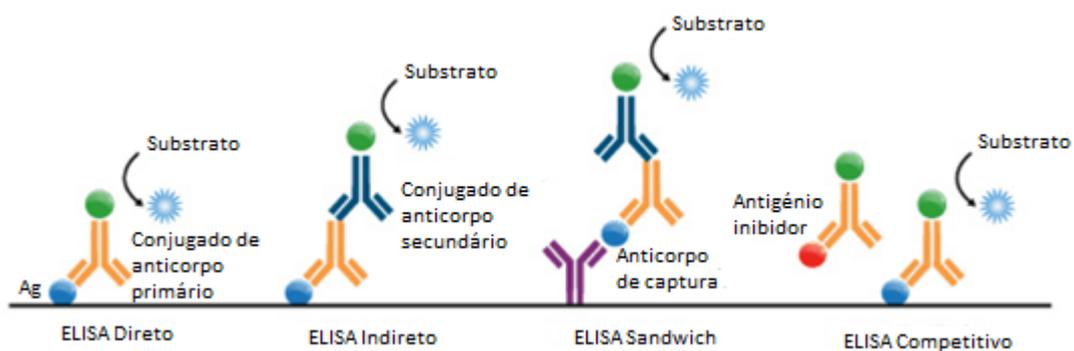


Figura 8: Procedimentos de ELISA: ELISA Direto, ELISA Indireto, ELISA *Sandwich*. e ELISA Competitivo (adaptado de [7]).

Os ELISAs *sandwich* normalmente requerem o uso de pares de anticorpos correspondentes, em que cada anticorpo é específico para uma parte diferente e não sobreposta (epítipo) da molécula de antígeno. Um primeiro anticorpo (conhecido como anticorpo de captura) é revestido nos poços. A solução da amostra é então adicionada ao poço. Um segundo anticorpo (conhecido como anticorpo de detecção) segue esta etapa para medir a concentração da amostra. Tem a vantagem de ser altamente específico, já que o antígeno/analito é capturado e detetado especificamente, é adequado para amostras complexas pois o antígeno não requer purificação antes da medição, e é flexível e sensível pois podem ser usados métodos de detecção direta ou indireta [7].

Para o método de ELISA foi utilizada uma placa de 96 poços, revestida com anticorpo anti Pla a 1 (Roxall, P-06) (anticorpo de captura) com concentração de trabalho 2 mg/mL. O anticorpo anti Pla a 1 havia sido liofilizado e, portanto, foi reconstituído com 100 µL de PBS 1x (para 1 L: NaCl 0.137 M, KCl 0.0027 M, 0.01 M Na₂HPO₄, 0.0018 M KH₂PO₄). De seguida, a 10 µL de anticorpo de captura reconstituído, adiciona-se 10 µL de PBS 1x. A esta mistura adiciona-se 10 mL de PBS 1x, ficando assim com o anticorpo de captura. Em cada poço foi adicionado 100 µL de anticorpo de captura com uma pipeta multicanal (por inversão). As placas foram tapadas, identificadas e colocadas em frigorífico (6 °C) *overnight*.

No dia seguinte, as placas foram lavadas 3x com tampão de lavagem (10 mM tampão fosfato pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) a temperatura ambiente, e foram adicionados 180 µL de tampão de bloqueio (tampão de lavagem, 1% BSA) em cada poço, com pipeta multicanal sem inversão. A placa tapada foi colocada em agitação suave durante 1 h, à temperatura ambiente. De seguida foi preparada a curva padrão (preparada com diluições seriadas de Pla a 1 natural (Roxall, S-08), os controlos e amostras. Após 1 h de incubação com tampão bloqueio, a placa foi sacudida sem lavar, e adicionaram-se 100 µL/poço de cada amostra, padrões e controlos como previsto no desenho da placa, e incubou-se a placa durante 2 h à temperatura ambiente. De seguida, lavaram-se as placas 3x com tampão de lavagem, e adicionaram-se 100 µL/poço de anticorpo de detecção biotilado (Bial, B-07), exceto nos poços com controlo negativo, e incubou-se 1 h à temperatura ambiente. Após incubação, lavou-se 3x com tampão de lavagem e adicionaram-se 100 µL/poço de enzima estreptavidina-peroxidase (POX) (Sigma, S5512), incubou-se 45 min em agitação suave e a temperatura ambiente. Por fim, após o tempo de incubação, lavaram-se as placas 3x com tampão de lavagem, e adicionaram-se 100 µL/poço de TMB (a temperatura ambiente), taparam-se as

placas e colocou-se em agitação suave durante 15 min. Terminado o tempo, a reação foi parada adicionando 100 µL/poço de solução STOP (H₂SO₄ 1.5 M) como exemplificado na Figura 9B, cronometrando 10 s entre cada adição de cada coluna. A absorvância foi lida a 450 nm e a 630 nm.

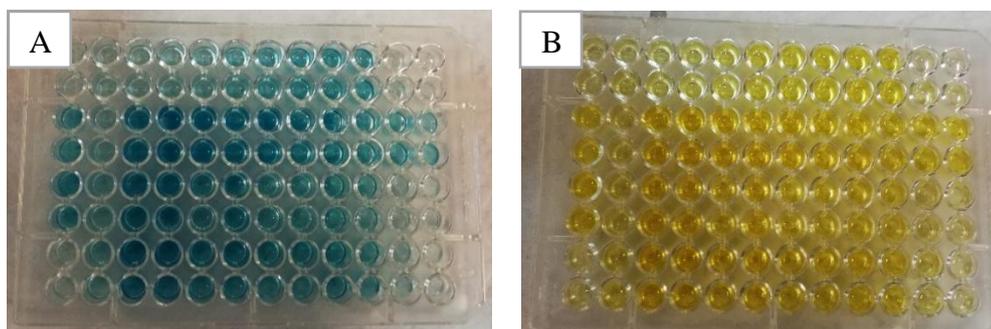


Figura 9: Quantificação de Pla a 1 por ELISA em amostras, com curva padrão nas duas primeiras colunas. Exemplo de antes (A) e depois (B) de aplicação de solução STOP.

3.3.10. Identificação de bandas imunorreativas por *immunoblotting*

A identificação das bandas imunorreativas por *immunoblotting* inicia-se pela preparação dos géis, seguido de SDS-PAGE e, por fim, transferência eletroforética e imunodeteção.

Western blotting ou *immunoblotting* de proteínas é uma técnica laboratorial para detetar proteínas específicas de uma amostra celular ou tecidual. A técnica foi descrita inicialmente por Towbin et al. em 1979 e o nome inventado por Burnette em 1981 para corresponder a técnicas semelhantes usadas para deteção de DNA, *Southern blotting* (Southern, 1975), e RNA, *Northern blotting* (Alwine et al., 1977). Esta técnica requer a separação de proteínas de acordo com seu tamanho por eletroforese em gel, seguida por eletrotransferência das proteínas para uma membrana que é “sondada” com um anticorpo contra a proteína de interesse (Gwozdz & Dorey, 2017).

O primeiro passo é a preparação da amostra, que requer a lise celular, que no caso de tecidos é precedida por homogeneização mecânica ou enzimática, para extrair e solubilizar proteínas. Dependendo das estruturas celulares e tipo de célula, podem ser utilizados diferentes tampões de lise, normalmente compostos por um agente tamponante (como Tris-HCl), sais como cloreto de sódio, lípidos que rompem detergentes e inibidores de proteases para evitar a degradação de proteínas. Detergentes iónicos, como duodecil sulfato de sódio (SDS), são fortes agentes solubilizantes, mas desnaturam proteínas que prejudicam a sua

atividade e interações. É útil conhecer a concentração de proteína nos lisados para controlar a quantidade introduzida no gel e permitir a comparação entre as experiências. A concentração de proteínas pode ser medida usando o método de Bradford, método de Lowry ou método do ácido bicinconínico (BCA).

A etapa final é misturar as amostras com um tampão de carga composto por glicerol para aumentar a densidade da amostra, facilitando a sua entrada no gel, um corante que torna a amostra visível (bromofenol ou azul de Coomassie), agentes que reduzem as ligações dissulfeto (β -mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT)) e, no caso de condições desnaturantes, SDS. Para garantir a desnaturação completa das proteínas, as amostras são geralmente colocadas a 95 °C por 5 a 10 min, mas a prolongação pode levar à degradação ou agregação de proteínas. As amostras são então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), que separa as proteínas tendo em conta a sua estrutura e ponto isoelétrico (PAGE nativo) ou tendo em conta o seu tamanho (SDS-PAGE). As proteínas precisam de ter uma carga negativa para migrar através dos poros do gel quando submetidas a um campo eletromagnético. No SDS-PAGE, todas as proteínas são carregadas negativamente devido à ligação com SDS, sendo este uma molécula carregada negativamente que se torna covalentemente acoplada a proteínas ao longo do seu comprimento após exposição ao calor, o que além de desnaturar a proteína, também transmite uma carga negativa proporcional ao seu comprimento. Após a introdução da amostra de proteína no gel e a aplicação de um campo elétrico vertical do topo do gel para o fundo, as proteínas são repelidas do polo negativo (o cátodo) e migram para o polo positivo (o ânodo). Devido ao efeito de peneiração molecular da matriz de gel, as proteínas dentro da mistura são dissolvidas em zonas (bandas) discretas, com as menores proteínas a deslocarem-se para mais longe através do gel (Gwozdz & Dorey, 2017; J. Delves et al., 2011).

As proteínas separadas por PAGE precisam de ser transferidas do gel para uma membrana por transferência eletroforética (ou eletrotransferência) para posterior processamento. É preparado um *blot sandwich* onde uma membrana toca com firmeza no gel e está entre papel de filtro num tampão de transferência. É importante garantir um bom contato entre o gel e a membrana, pois as bolhas de ar impedem a transferência. A membrana utilizada poderá ser de nitrocelulose ou PVDF (fluoreto de polivinilideno). É aplicado um campo eletromagnético perpendicularmente à superfície do gel para transferir as proteínas do gel para a membrana. As membranas usadas na eletrotransferência são caracterizadas por altas capacidades de

ligação às proteínas e, portanto, a superfície desocupada pelas proteínas transferidas requer bloqueio para reduzir o fundo.

Após o bloqueio, é necessário a membrana ser “sondada” com um anticorpo que reconheça a proteína de interesse. Esta é uma etapa essencial e pode exigir uma otimização extensiva, pois cada anticorpo terá força e especificidade diferentes. Poderá ser uma “sondagem” de uma etapa, em que o anticorpo contra a proteína de interesse é conjugado com uma enzima (como a fosfatase alcalina (AP)) ou um fluoróforo que permite sua detecção; ou uma “sondagem” de duas etapas, em que são utilizados dois anticorpos diferentes: o anticorpo primário contra a proteína de interesse e um anticorpo secundário e conjugado contra o anticorpo primário. O mais utilizado é a avidina ou a estreptavidina, que de maneira semelhante a um anticorpo pode ser conjugado e se liga à biotina e, portanto, reconhece todas as proteínas biotiniladas.

Dependendo do substrato, a reação química catalisada pela enzima emite luz (quimioluminescência), que pode ser detetada usando filmes de raios-X ou equipamento de imagem (como por exemplo GelDoc) ou fornece um produto final visível, que precipita na membrana (cromogénico/deteção colorimétrica) (Gwozdz & Dorey, 2017).

Neste trabalho, para iniciar o *immunoblotting*, em primeiro lugar, preparou-se o sistema de SDS-PAGE. Para isso, foram montados os vidros juntamente com o restante material de sistema eletroforético, tendo o cuidado de limpar os vidros com etanol para evitar qualquer contaminante que possa comprometer a polimerização dos géis, e de seguida prepararam-se o gel de resolução e gel de concentração (Figura 10A). O gel de resolução (12%) preparou-se com 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 M, 100 µL de SDS 10%, 3,4 mL de H₂O Milli Q, 4 mL de acrilamida/Bis 30%, 75 µL de APS 10% e 5 µL de TEMED. Aplicou-se o gel de concentração no sistema, sem criar bolhas e adicionou-se H₂O Milli Q sobre o gel para evitar contacto com o ar. Preparou-se de seguida o gel de concentração (4%) com 1 mL de Tris-HCl 0,5 M, 40 µL de SDS 10%, 2,43 mL de H₂O Milli Q, 0,53 mL de acrilamida/Bis 30%, 24 µL de APS 10% e 4,4 µL de TEMED. Após o gel estar polimerizado, removeu-se a água por inversão, aplicou-se a solução no sistema de eletroforese até ao topo, colocou-se o pente até o gel polimerizar. Após polimerização, retiraram-se os pentes e lavaram-se os poços com água. De seguida, montou-se a câmara interna, encheu-se a mesma com tampão de corrida 1x (diluindo tampão de corrida 10x: 25 mM Tris base, 250 mM, 0,1% SDS, pH 8.3) e aplicaram-se 18 µL de amostras e 6 µL de padrão (Precision PMS Protein Dual Color standards 500 µL #1610374

Unstained), após as amostras terem sido colocadas em banho seco a 95 °C durante 5 min. As amostras foram preparadas com tampão de amostra 6x (Tris-HCl 300 mM, pH 6.8, SDS 12%, glicerol 30%, azul bromofenol 0.06%, DTT 600 mM). Encheu-se a câmara externa do sistema com tampão de corrida 1x, ligou-se à fonte de alimentação a 140 V (60 mA, 15 W), como ilustrado na Figura 10B, e apenas se desligou a corrente quando o azul de bromofenol atingiu o fim do gel, o que ocorreu em aproximadamente 1h30.

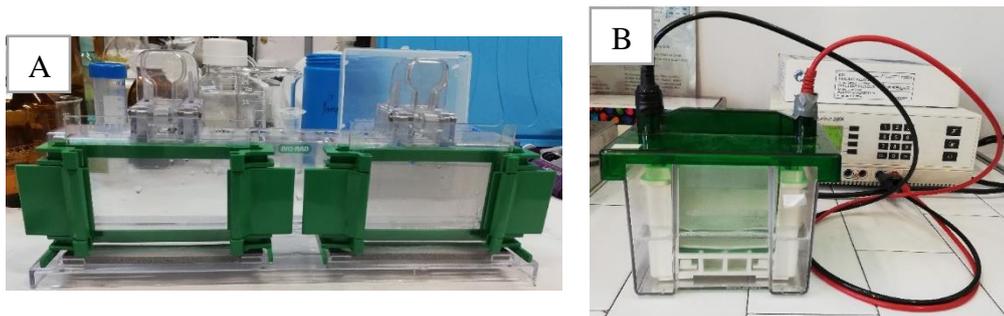


Figura 10: Preparação de géis (A), e sistema eletroforético e eletroforese a decorrer (B).

Após o término da corrida, preparou-se o passo seguinte: a transferência eletroforética (Figura 11). Foi necessário cortar a membrana de PVDF e papel de filtro com as dimensões do gel, identificando cada membrana fazendo um corte no canto superior esquerdo, e ativou-se a membrana colocando-a 5 s em metanol, 5 min em H₂O destilada e 15 min em solução de transferência (Tris-HCl 25 mM, pH 8.3, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0.037%). Após o tempo de ativação, removeu-se e descartou-se o gel de concentração com uma espátula, entre as duas placas de vidro, e separou-se o gel de resolução com auxílio de uma espátula e solução de transferência. Embebeu-se a membrana, papel de filtro e placas de fibra em tampão de transferência 15 min e preparou-se a *sandwich* do gel: colocou-se em primeiro lugar (em baixo) a cassette com a face cinzenta para baixo, em cima colocou-se uma placa de fibra humedecida, de seguida uma folha de papel de filtro, o gel equilibrado, a membrana humedecida sobre o gel, outra folha de papel de filtro e uma placa de fibra. É muito importante que se removam todas as bolhas entre cada camada pressionando e arrastando para os lados, para que se observem bons resultados. As cassetes foram fechadas, não movendo qualquer componente no seu interior, colocaram-se as cassetes, uma unidade de arrefecimento e um agitador magnético no módulo, para que a temperatura do tampão e distribuição iónica se mantivessem constantes, e encheu-se completamente o tanque com solução de transferência.

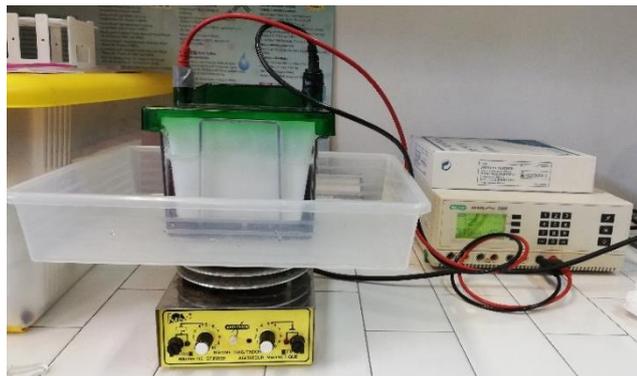


Figura 11: Processo de transferência eletroforética.

Após terminar a transferência, retirou-se a membrana do sistema de transferência, e colocou-se na solução de bloqueio 5% (100 mL TBS-T, 5 g leite em pó), durante 2 h em agitação e à temperatura ambiente como ilustrado na Figura 12. Neste processo foi necessário localizar os marcadores de massas moleculares, logo após o término da transferência, e foi necessário corar a membrana com Ponceau S. Segue-se o bloqueio da membrana, que foi realizado por incubação da mesma em solução de proteína de leite 5% em TBST, 2 h à temperatura ambiente, em agitação constante (Figura 12). Após o tempo de bloqueio, a membrana foi incubada com a solução de anticorpos primários a 4 °C *overnight* em agitação. A solução de anticorpos primários foi constituída por: a) soro de paciente com IgE negativa, diluído com TBST (1:20) (paciente VO5); b) pool de soros de pacientes com Prick+, RAST+ e sintomas (pacientes S1 e S9), diluídos com TBST (1:20). No dia seguinte, a membrana foi lavada 3x durante 10 min com TBS-T, e incubada com a solução de anticorpo secundário Anti-IgE humana (I6510), diluída 1:5000 com TBST, durante 2 h, à temperatura ambiente, em agitação. De seguida, a membrana foi lavada 3x durante 10 min com TBS-T e, por fim, incubada com anticorpo terciário, neste caso Anti-IgG de ratinho (A9044), diluído com TBST (1:15000). Após o término da incubação, ocorreram 3 lavagens com TBS-T durante 10 min.



Figura 12: Membranas em solução de bloqueio após transferência eletroforética.

Para a revelação com TMB, a membrana foi colocada sobre papel de filtro, retirando o excesso de líquido, colocou-se a membrana numa tina de vidro e cobriu-se completamente a membrana com solução de TMB, durante 5 a 10 min, à temperatura ambiente. Aguardou-se até o produto da reação ser visível (cor azul), e removeu-se o substrato enquanto o background se mantinha baixo. Lavou-se a membrana com água ultrapura e captou-se a imagem com câmara, tendo o cuidado de secar bem a membrana. Guardou-se a membrana entre papel de filtro e papel de alumínio.

3.4. Análise dos eletroforetogramas

A análise dos eletroforetogramas foi realizada utilizando o programa ImageJ (imagej.nih.gov/ij/).

3.5. Análise estatística

Foram efetuadas correlações e testadas as diferenças das médias por análise de variância fator único (ANOVA) utilizando o Excel. Os valores significativamente diferentes (SD) são representados por valores de $p < 0.05$.

Capítulo IV:
**RESULTADOS E
DISCUSSÃO**



4.1. Caracterização dos níveis polínicos e do alergénio Pla a 1 em amostras de ar representativas da zona de Évora

No ano de 2019, a época polínica de *P. hybrida* iniciou a de 4 de março e terminou a 7 de abril, mais cedo do que em 2018, cuja época polínica foi de 20 de março a 23 de abril. Na Figura 13 pode ainda observar-se que o pico polínico foi mais precoce em 2019, sendo a 11 de março, e em 2018 a 1 de abril. Os valores de grão de pólen por metro cúbico de ar foram mais elevados no ano de 2018, atingindo valores máximos de 453 grãos de pólen/m³ no pico, do que no ano de 2019 (289 grãos de pólen/m³).

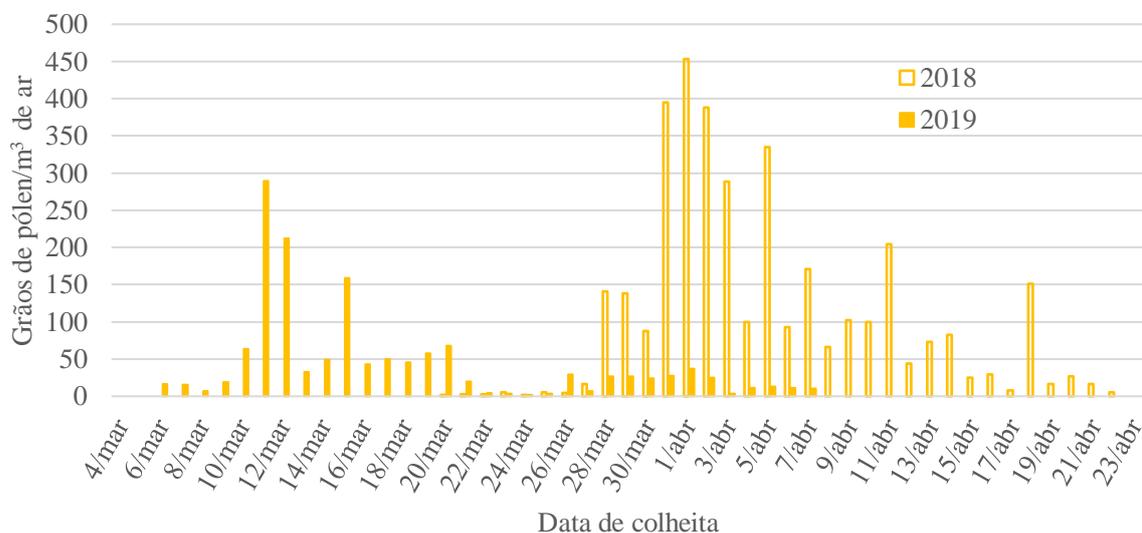


Figura 13: Valores de grãos de pólen por m³ de ar em Évora, nos anos de 2018 e 2019, nas respetivas épocas polínicas de *P. hybrida*.

Sabendo que os valores de grãos de pólen por metro cúbico são mais elevados em 2018, seria interessante verificar se os valores de alergénio mantinham o mesmo perfil. Para isso realizaram-se amostragens de ar com o captador ChemVol e nelas quantificou-se o alergénio *major* Pla a 1 (Figura 14).

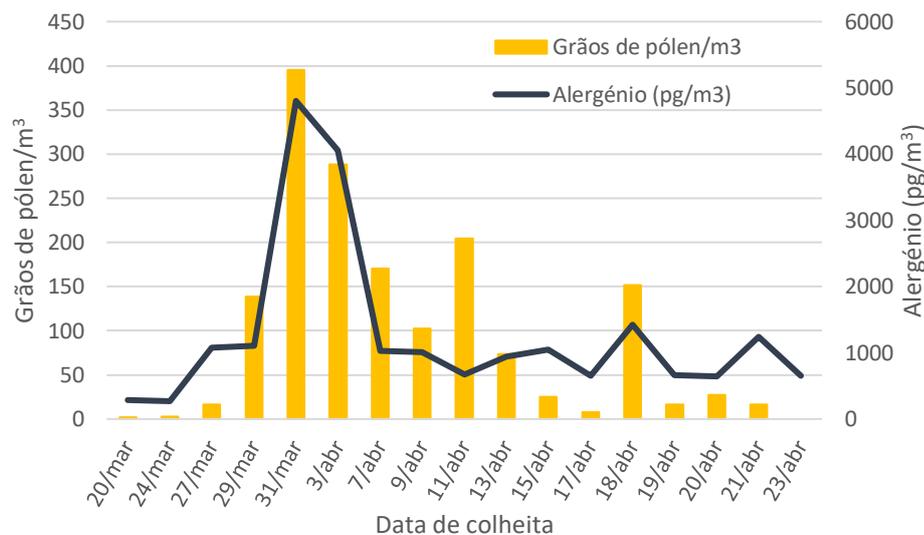


Figura 14: Perfil de pólen por m³ de ar (barras) e quantidade de alergénio Pla a 1 por m³ de ar (linha), em Évora, na época polínica de *P. hybrida* no ano de 2018

Observa-se que os perfis são semelhantes e que o pico de grãos de pólen por metro cúbico de ar coincide com o pico de alergénio, no dia do pico de polinização.

Relativamente à correlação entre alergénio e grãos de pólen, observa-se na que o coeficiente de correlação (R²) é 0,7257, sendo correlação forte.

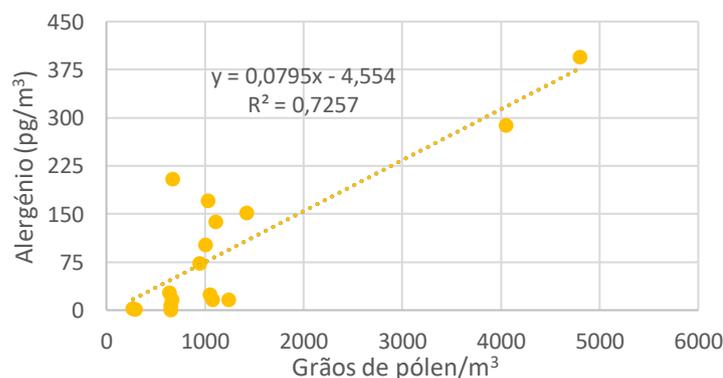


Figura 15: Correlação entre a concentração de alergénio Pla a 1 (pg/m³), e o número de grãos de pólen por m³ de ar, em Évora, no ano de 2018.

São considerados dias de risco alérgico para esta espécie aqueles em que se detetam níveis polínicos superiores a 50 grãos de pólen/m³ (Alcázar et al., 2004; Nowak et al., 2012) e dias de elevado risco quando os níveis são superiores a 150 a grãos de pólen/m³. Podemos

identificar em 2018 18 dias com risco alérgico e 5 dias de elevado risco. Já em 2019 podemos identificar 6 e 2 dias de risco e alto risco, respetivamente. Assim, pode dizer-se que a época polínica de *P. hybrida* é imunologicamente relevante em Évora.

Tendo em conta a caracterização da cidade de Évora em termos de perfil polínico e perfil alergénico de *P. hybrida* e de existirem nos anos analisados vários dias de elevado risco alérgico, é pertinente a escolha desta espécie como modelo biológico neste estudo.

Estes resultados estão de acordo com a literatura encontrada, que refere que em ambientes urbanos existe maior quantidade de poluentes atmosféricos, nomeadamente NO_2 , sendo os gases de escape de automóveis a fonte mais significativa de NO_2 no ar atmosférico (D'Amato, 2011).

4.2. Caracterização da qualidade do ar

A utilização do sensor uRAD monitor a3 permitiu caracterizar alguns parâmetros da qualidade do ar na cidade de Évora, num período em que o tráfego automóvel é particularmente intenso. Os resultados estão apresentados na Figura 16.

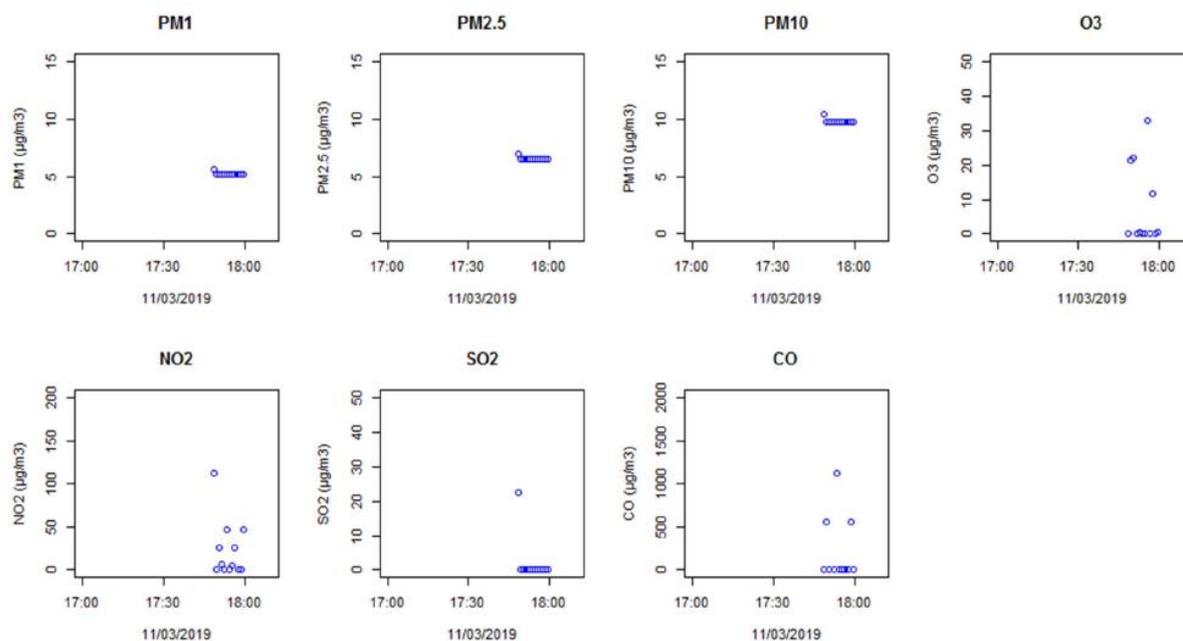


Figura 16: Dados de uRAD monitor a3.

Assim é possível observar que, no dia 13 de março de 2019, no período estudado, as partículas inferiores a 1 μm , 2,5 μm e 10 μm apresentaram-se em níveis perto dos 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respetivamente. O SO_2 apresentou uma medida única de 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, seguindo-se medições nulas. Os níveis de O_3 , NO_2 e CO apresentaram a maior variabilidade do período medido (0-32 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 0-110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, e 0-1100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respetivamente).

Tendo em conta que relativamente ao NO_2 , o valor-limite horário para a proteção da saúde é de 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Alcázar et al., 2004; Nowak et al., 2012) é possível verificar que esse valor foi pontualmente excedido no período avaliado. Relativamente ao O_3 , os valores medidos não excedem os valores alvo para proteção da saúde humana (120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, a não exceder mais de 25 dias, em média, por ano) (Alcázar et al., 2004; Nowak et al., 2012), no período avaliado, muito embora este não seja o período em que previsivelmente se atingem os valores mais elevados deste gás (Antón et al., 2011).

Estes dados revelam que, embora uma cidade pequena, com cerca de 50 000 habitantes, os valores de NO_2 atingidos na hora de maior tráfego automóvel podem ser preocupantes.

Dados de satélite permitiram ainda fazer a avaliação dos valores de NO_2 na troposfera, desde a superfície até 10 km de altitude, expressos em mol/m^2 , no concelho de Évora. Estes dados estão apresentados na figura seguinte.

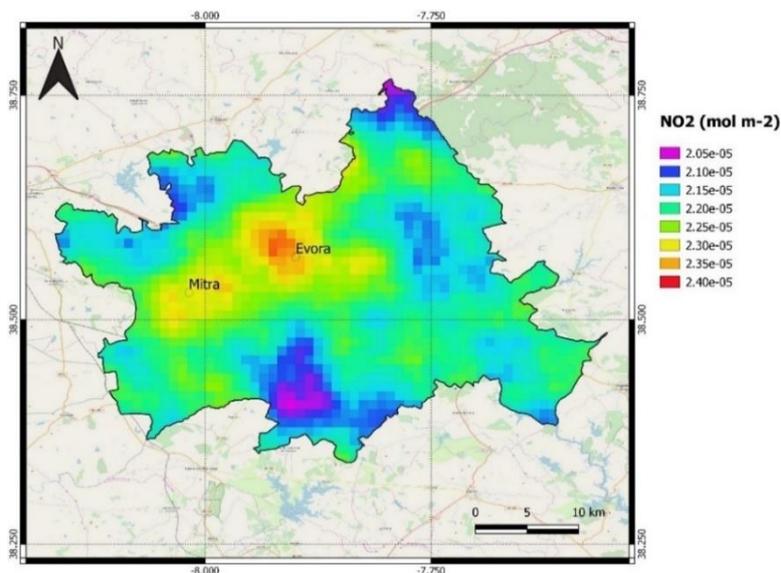


Figura 17: Coluna troposférica de NO₂ (da superfície a 10 km de altitude), em mol/m², sobre o concelho de Évora, obtida através do instrumento TROPOMI (TROPOspheric Monitoring Instrument) a bordo do satélite ESA Sentinel-5P. Os valores apresentados correspondem à média de 22 meses (01/01/2018 a 30/10/2019).

Através da observação da Figura 17, é possível observar que o concelho de Évora apresenta uma variação grande de NO₂ na troposfera, sendo os valores máximos, co-localizados com a cidade de Évora (2.30×10^{-5} e 2.40×10^{-5} mol/m²) e os valores mínimos nas zonas não urbanizadas. Estes resultados estão de acordo com a literatura encontrada, que refere que em ambientes urbanos existe maior quantidade de poluentes atmosféricos, nomeadamente NO₂, sendo os gases de escape de automóveis a fonte mais significativa de NO₂ no ar atmosférico (D'Amato, 2011).

Esta avaliação do NO₂ permite ainda constatar que na zona rural de Valverde, onde se insere a Herdade da Mitra, embora a uma curta distância da cidade, cerca de 12 km, este gás é detetado em níveis inferiores aos da cidade (2.30×10^{-5} e 2.35×10^{-5} mol/m²).

Como nos interessava comparar dois núcleos populacionais, com diferentes características em termos da qualidade do ar, optou-se por escolher como locais de amostragem a Cidade de Évora e a Herdade da Mitra.

4.3. Efeitos dos poluentes nas características do pólen

4.3.1. Avaliação da produção polínica em ambiente urbano e rural

A produção polínica pode ser indicativa do bem-estar na planta (Mimet et al., 2009). Realizou-se este estudo comparativo entre amostras colhidas na cidade de Évora e na Mitra. Os resultados da produção polínica em Évora e na Mitra, dada por grãos de pólen por antera, por inflorescência, em cada uma das árvores, podem observar-se nos gráficos abaixo (Figura 18A e 18B).

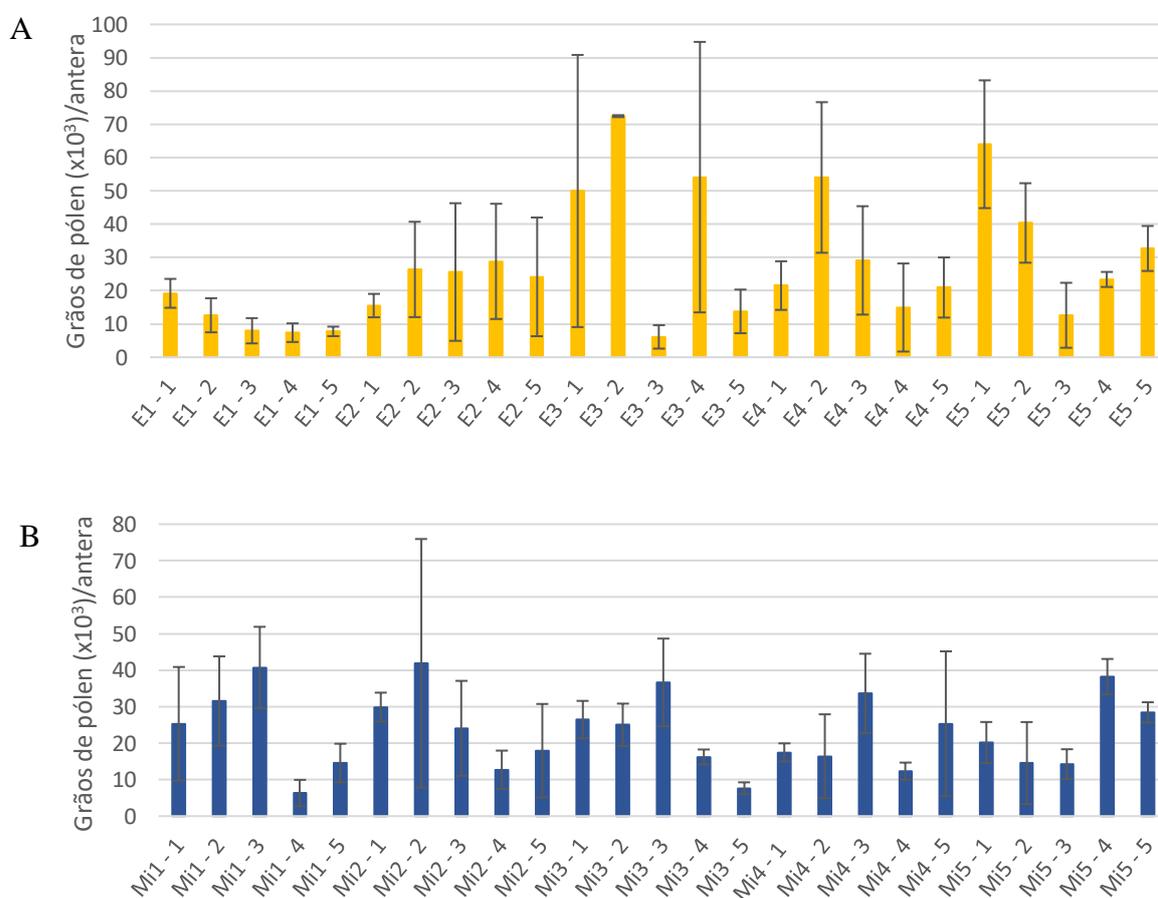


Figura 18: Grãos de pólen por antera em cada inflorescência. Em A representam-se dados relativos a Évora e em B relativos à Mitra, relativos ao ano de 2019. E1-E5 e Mi1-Mi5 representa cada uma das árvores de Évora e Mitra, respetivamente. Apresenta-se valores médios e respetivos desvios padrão.

Relativamente aos valores de produção polínica de Évora, na figura 18A observa-se que estes variam entre 8×10^3 e 73×10^3 grãos de pólen/antera, mas que a variação associada a cada amostra é muito diferente, sendo que a árvore 3 é a que apresenta amostras com maior

desvio-padrão. Em relação aos valores de produção polínica da Mitra, esta varia entre 8×10^3 e 42×10^3 grãos de pólen/antera e a variabilidade associada às amostras é inferior.

Na Figura 19A, observam-se os valores de grãos de pólen/antera por árvore. Verifica-se que em Évora, a produção polínica média por árvore varia entre 12×10^3 e 39×10^3 grãos de pólen/antera e, na Mitra, varia entre 22×10^3 e 25×10^3 grãos de pólen/antera.

Na figura 19B observa-se que a produção polínica média é semelhante em Évora e na Mitra, apresentando maior dispersão em Évora (entre 10977 e 39273 e 21023 e 25290 grãos de pólen/antera, em Évora e na Mitra, respetivamente).

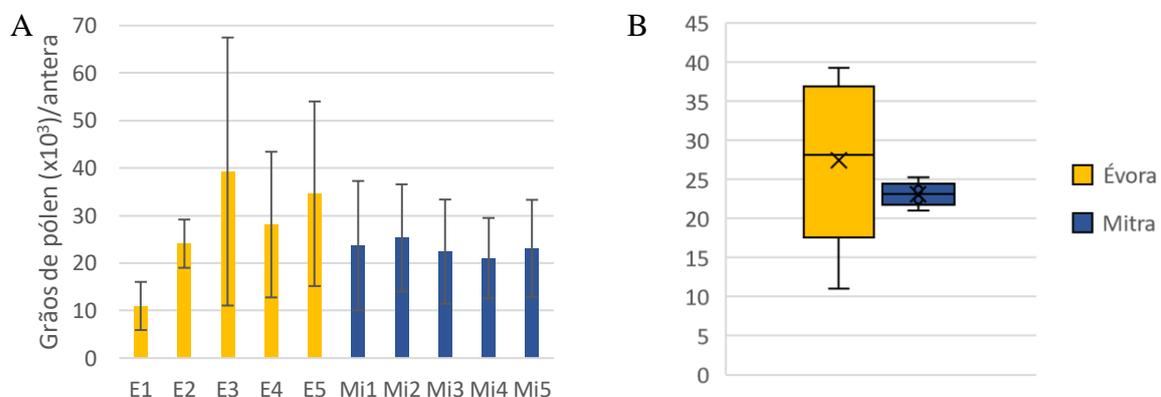


Figura 19: Valores de grãos de pólen/antera por árvore (A) e boxplot representativo dos valores por zona (B), em Évora e na Mitra em 2019. Em A representam-se valores médios \pm dp, relativos às 5 inflorescências analisadas.

A maior variabilidade associada à produção polínica por *Platanus hybrida* na cidade de Évora, relativamente à da Mitra pode estar associada a fatores de stress a que as árvores estão sujeitas. A maior variabilidade na produção polínica na cidade de Évora está não só associada a uma variabilidade maior entre árvores, mas também a uma viabilidade maior entre amostras colhidas na mesma árvore. Estando as árvores localizadas em torno de vias de circulação automóvel, pode levantar-se a hipótese de não estarem sujeita ao ar atmosférico de forma uniforme. Como as amostras colhidas não foram associadas a uma coordenada geográfica específica, apenas foram colhidas em zonas diferentes da copa da árvore, não podemos estabelecer esta associação. Contudo, estes resultados salientam a relevância de avaliar a produção polínica em função de parâmetros de qualidade do ar.

4.3.2. Determinação do efeito da qualidade do ar na proteína total e na expressão do alergénio *major* de *P. hybrida* (Pla a 1)

4.3.2.1. Avaliação da quantificação proteica

A quantificação de proteína presente nos extratos de *P. hybrida* dos anos de 2018 e 2019, apresentada na Figura 20, revelou que o conteúdo proteico do pólen oriundo da Mitra foi superior ao do pólen oriundo de Évora quer em 2018 (330 e 96 mg proteína/g pólen) quer em 2019 (702 e 490 mg proteína/g de pólen). Observa-se também que os valores entre a zona rural e urbana, em cada um dos anos em estudo, são significativamente diferentes.

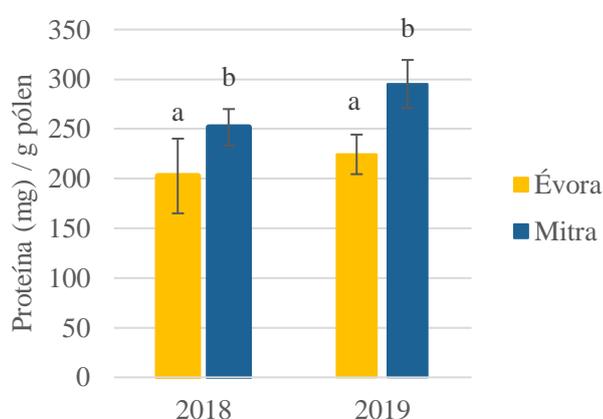


Figura 20: Comparação da relação proteína/pólen numa zona urbana (Évora) e numa zona rural (Mitra) nos anos de 2018 e 2019. Valores de proteína(mg) por g de pólen, respetivos desvios padrão e diferenças significativas assinaladas, sendo que a e b são diferentes.

Contudo o conteúdo proteico total pode não ter significado alergológico e, assim, desenvolveram-se metodologias específicas que nos permitam avaliar a alergenicidade do pólen, apresentadas nos subcapítulos seguintes.

4.3.2.2. Avaliação da relação entre Pla a 1 e pólen por ELISA

Na Figura 21 é possível observar que a concentração de Pla a 1 nas amostras polínicas da Mitra é inferior à das colhidas em Évora, em ambos os anos em estudo, quer exprimindo os resultados por massa de proteína, ou por massa de pólen.

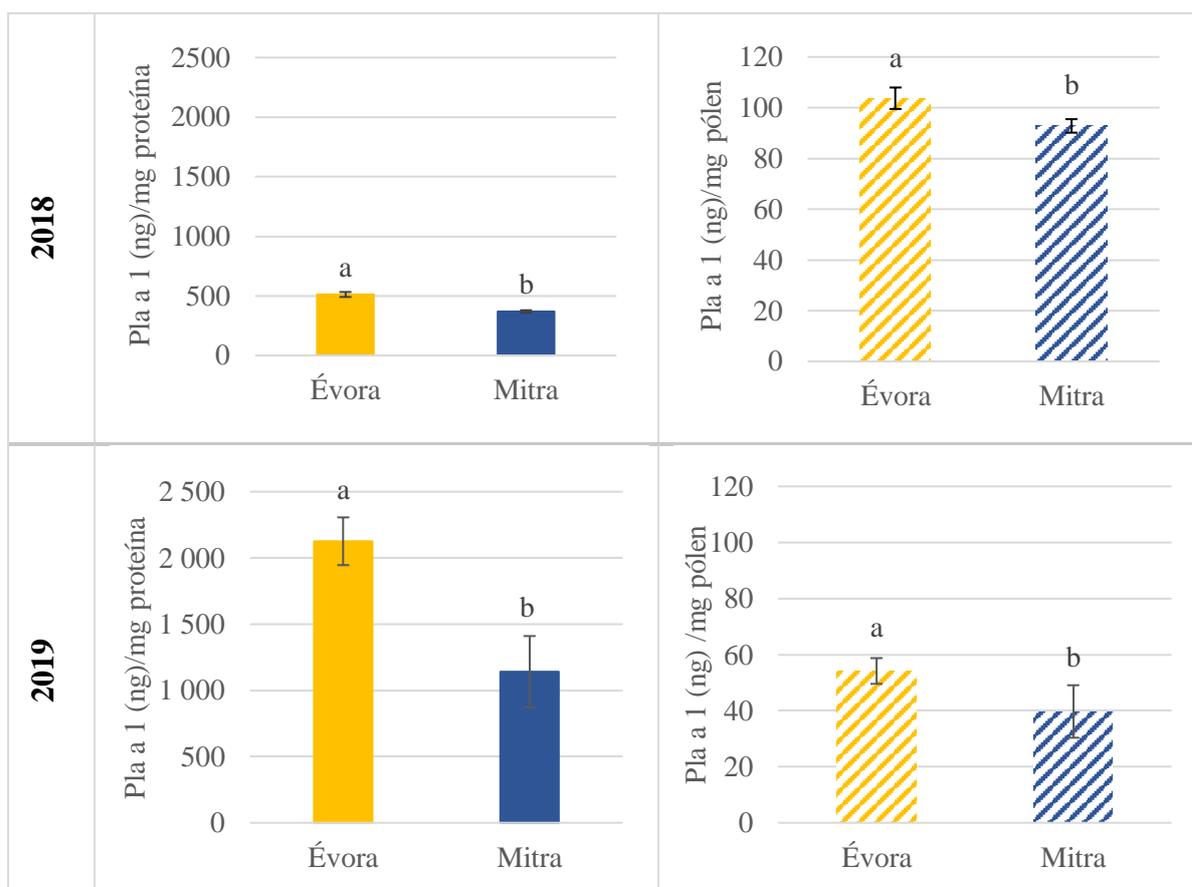


Figura 21: Relação entre Pla a 1 e proteína, bem como Pla a 1 e pólen, em Évora e Mitra nos anos de 2018 e 2019. Indicação de que os conjuntos de resultados são significativamente diferentes, sendo a diferente de b.

Relativamente à comparação entre anos, o valor de Pla a 1 por mg de proteína é cerca de quatro vezes superior em 2019, mas o valor de Pla a 1 por mg de pólen é cerca de duas vezes superior no ano de 2018. Isto pode ser suportado pelo facto de a concentração de proteína por grama de pólen ser superior em 2019.

Uma concentração aumentada de Pla a 1 associada a poluição atmosférica foi também descrita por (Lu et al., 2014; Sedghy et al., 2017), pelo que os resultados deste trabalho estão em concordância com estes.

4.3.3. Estudo comparativo do perfil proteico do pólen de *P. hybrida* e identificação de bandas imunorreativas

Para comparar o perfil proteico do pólen de *P. hybrida*, foram estudadas as bandas imunorreativas obtidas por immunoblotting, com a utilização de um pool de soros de

indivíduos alérgicos (Figura 22). Foi ainda realizado um controlo negativo do *immunoblotting*, fazendo a incubação da membrana com um soro IgE negativo.

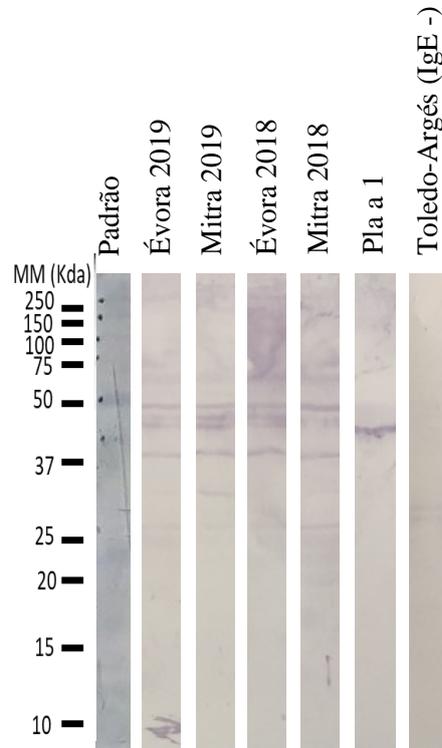


Figura 22: Bandas de *immunoblotting*. Após separação por SDS-PAGE do padrão e amostras (Évora 2018 e 2019, Mitra 2018 e 2019, bem como Pla a 1 (proteína purificada)) e electrotransferência para uma membrana de PVDF, a membrana foi marcada com um pool de soros de indivíduos alérgicos a *P. hybrida* (bandas 2-5) e com um soro de indivíduo não alérgico (IgE negativo), que serve de controlo negativo da experiência (pólen de Toledo-Argés). A figura é representativa de dois ensaios independentes.

A Figura 23 apresenta a análise do blot em termos de massas moleculares das bandas imunorreativas e das respetivas intensidades de banda.

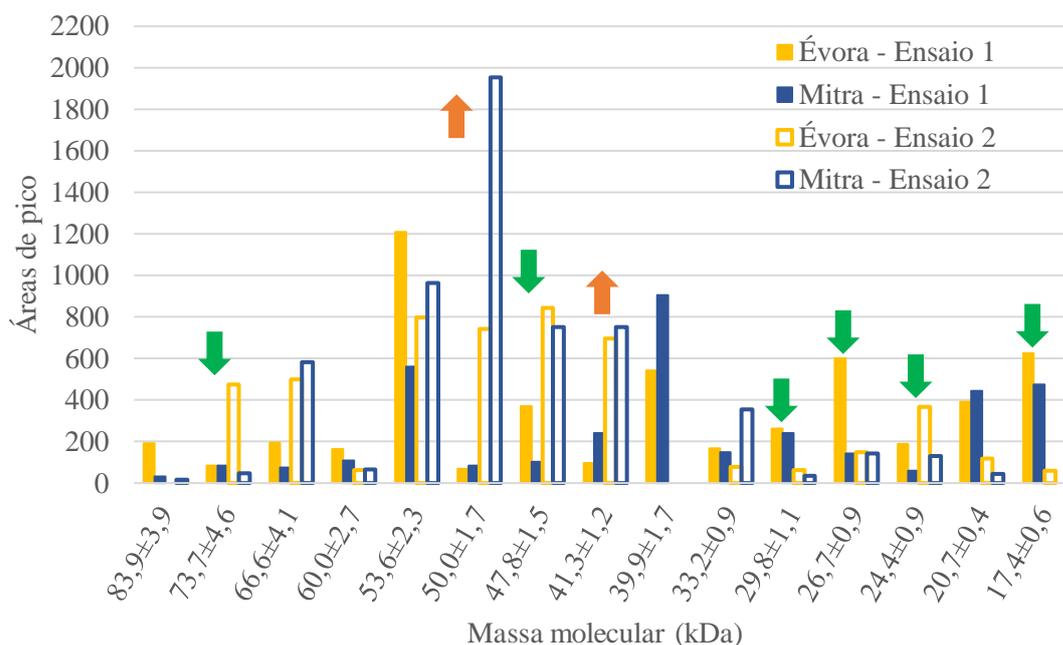
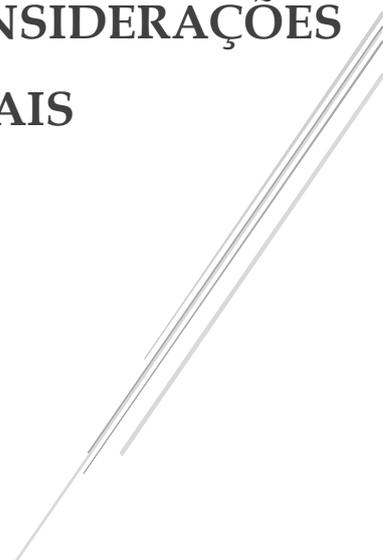


Figura 23: Áreas de pico correspondentes a cada massa molecular identificada e respetivos desvios padrão, de Évora e Mitra, no ano de 2019. Comparação entre Évora e Mitra, nos anos correspondentes. As setas verdes indicam uma diminuição de intensidade da Mitra, em relação a Évora, em ambos os ensaios, e as setas vermelhas indicam uma diminuição de intensidade da Mitra, relativamente a Évora.

O perfil de IgE revela imunorreatividade aumentada de diversas proteínas de *P. hybrida* colhidas em Évora, relativamente às colhidas na Mitra, sendo que foram identificadas seis proteínas com menor imunorreatividade na Mitra, relativamente a Évora, e duas proteínas com variação inversa. Pode dizer-se ainda que nas bandas com imunorreatividade diminuída na Mitra, relativamente a Évora, inclui-se o alergénio *major* Pla a 1 ($47,8 \pm 1,5$ kDa) e ainda proteínas com massa molecular compatível com o Pla a TLP ($24,4 \pm 0,9$ kDa) e com o Pla a 8 ($17,4 \pm 0,6$ kDa).

Os trabalhos de Sedghy et al. (2018) e Ghiani et al. (2012) apresentam também uma imunorreatividade aumentada do pólen de *Platanus hybrida* em ambientes poluídos ou sujeitos a poluentes ambientais.

Capítulo V:
**CONSIDERAÇÕES
FINAIS**



De um modo geral os resultados apresentados nesta dissertação evidenciam uma polínica de plátano que se caracteriza por atingir concentrações de pólen acima do valor limiar para ocorrência de sintomas de alergia durante um período significativo (mais de 3 semanas) havendo mesmo risco elevado para os alérgicos durante 1-2 semanas. Observou-se também uma forte correlação do Pla a 1 e do pólen de plátano, observando-se um paralelismo entre os dois parâmetros, sugerindo que os alergénios estão maioritariamente associados ao pólen, de modo que o risco de exposição ocorre a estes alergénios durante a época de polinização do plátano.

O objetivo principal deste trabalho consistiu em procurar caracterizar a capacidade de produção e as características alergénicas de pólen colhido em plátanos cujo habitat tem características urbanas em comparação com plátanos situados num ambiente com características predominantemente rurais, e onde os níveis de NO₂ são, em média, inferiores. Os resultados mostram que, apesar do conteúdo proteico ser superior na Mitra comparando com Évora, o conteúdo em Pla a 1 foi inferior, apontando para menor alergenicidade do pólen das árvores que se encontram em num ambiente predominantemente rural.

Em concordância com estes resultados, os perfis em alergénios revelaram maior imunorreactividade num conjunto de bandas proteicas que incluem o Pla a 1, um alergénio *major* do plátano, o Pla TLP e o Pla a 8, que pertencem a famílias de pan-alergénios.

No seu conjunto, os resultados obtidos sugerem que há fatores característicos do ambiente urbano, onde o NO₂ poderá ser um dos relevantes, que afetam a produção polínica e as características do pólen, nomeadamente, a concentração proteica e o perfil proteico, induzindo um aumento de expressão de alergénios, como é o caso do Pla a 1, provocando um aumento da alergenicidade do pólen, e, assim, impactos mais severos na saúde respiratória dos alérgicos.

Mais estudos deverão ser desenvolvidos no sentido de compreender qual ou quais os fatores ambientais que mais contribuem para a maior alergenicidade do pólen em ambiente urbano.

Capítulo VI:
REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS



- A. Burtis, C., R. Ashwood, E., & E. Burns, D. (2008). *Tietz-Fundamentals of Clinical Chemistry* (6th ed.). Saunders, Elsevier Inc.
- A. Smith, J., Flowers, P., & Larkin, M. (2009). *Interpretative Phenomenological Analysis: Theory Method and Research (Book Review)*.
- Albertine, J. M., Manning, W. J., Dacosta, M., Stinson, K. A., Muilenberg, M. L., & Rogers, C. A. (2014). Projected Carbon Dioxide to Increase Grass Pollen and Allergen Exposure Despite Higher Ozone Levels, 9(11), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111712>
- Alcázar, P., Cariñanos, P., De Castro, C., Guerra, F., Moreno, C., Domínguez-Vilches, E., & Galán, C. (2004). Airborne plane-tree (*Platanus hispanica*) pollen distribution in the city of Córdoba, South-western Spain, and possible implications on pollen allergy. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 14(3), 238–243.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J., & Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5350–5354. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5350>
- Antón, M., Bortoli, D., Costa, M. J., Kulkarni, P. S., Domingues, A. F., Barriopedro, D., ... Silva, A. M. (2011). Temporal and spatial variabilities of total ozone column over Portugal. *Remote Sensing of Environment*, 115(3), 855–863. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2010.11.013>
- Armentia, A., Lombardero, M., Callejo, A., Barber, D., Martín Gil, F. J., Martín-Santos, J. M., ... Arranz, M. L. (2002). Is *Lolium* pollen from an urban environment more allergenic than rural pollen? *Allergologia et Immunopathologia*, 30(4), 218–224. [https://doi.org/10.1016/S0301-0546\(02\)79124-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0546(02)79124-6)
- Asturias, J. A., Ibarrola, I., Bartolomé, B., Ojeda, I., Malet, A., & Martínez, A. (2002). Purification and characterization of Pla a 1, a major allergen from *Platanus acerifolia* pollen. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 57(3), 221–227. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2002.03406.x>
- Asturias, J. A., Ibarrola, I., Amat, P., Tella, R., Malet, A., & Cister, A. (2006). Purified allergens vs . complete extract in the diagnosis of plane tree pollen allergy *Clinical and Experimental Allergy*, 1505–1512.

Asturias, Juan A., Ibarrola, I., Eraso, E., Arilla, M. C., & Martínez, A. (2003). The major *Platanus acerifolia* pollen allergen Pla a 1 has sequence homology to invertase inhibitors. *Clinical and Experimental Allergy*, 33(7), 978–985. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01707.x>

Bosch-Cano, F., Bernard, N., Sudre, B., Gillet, F., Thibaudon, M., Richard, H., ... Ruffaldi, P. (2011). Human exposure to allergenic pollens: A comparison between urban and rural areas. *Environmental Research*, 111(5), 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.04.001>

Burks, A. W., T Holgate, S., E O’Hehir, R., B. Bacharier, L., H. Broide, D., K. Khurana Hershey, G., & Peebles, S. (2019). *Middleton’s Allergy E-Book: Principles and Practice*. (E. H. Sciences, Ed.) (9th ed.).

Burnette, W. N. (1981). “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)

Butteroni, C., Afferni, C., Barletta, B., Iacovacci, P., Corinti, S., Brunetto, B., ... Di Felice, G. (2005). Cloning and expression of the *Olea europaea* allergen Ole e 5, the pollen Cu/Zn superoxide dismutase. *International Archives of Allergy and Immunology*, 137(1), 9–17. <https://doi.org/10.1159/000084608>

Cariñanos, P., & Casares-Porcel, M. (2011). Urban green zones and related pollen allergy: A review. Some guidelines for designing spaces with low allergy impact. *Landscape and Urban Planning*, 101(3), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2011.03.006>

Chehregani, A., Majd, A., Moin, M., Gholami, M., Sharitzadeh, M., & Mohsenzade, F. (2004). Effect of Air Pollution on Some Cytogenic Characteristics, Structure, Viability and Proteins of *Ziinia elegans* Pollen Grains. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(1), 118–122. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2004.118.122>

Conti, A., Alessio, M., Pesca, M., Soldarini, A., Breda, D., Pigatto, P. D., & Burastero, S. E. (2014, March). *Phleum pratense* manganese superoxide dismutase identified by proteomic: A new candidate grass allergen. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/j.anai.2013.12.015>

Cortegano, I., Civantos, E., Aceituno, E., Del Moral, A., López, E., Lombardero, M., ... Lahoz, C. (2004). Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 59(5), 485–490. <https://doi.org/10.1046/j.1398-9995.2003.00363.x>

Costa, A. R., Mendes, S., Galveias, A., Arriegas, R., Ribeiro, H., Antunes, C. M., & Noronha, I. (2017). Augmented pollen superoxide dismutase activity induced by NO₂ and O₃. In *MedPalyno2017* (p. 97).

D'Amato, G., Cecchi, L., D'Amato, M., & Liccardi, G. (2010). Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: An update. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 20(2), 95–102.

D'Amato, Gennaro. (2011). Effects of climatic changes and urban air pollution on the rising trends of respiratory allergy and asthma, 6(1), 28–37.

D'Amato, Gennaro, Maesano, A., Molino, A., & Vitale, C. (2016). Thunderstorm-related asthma attacks. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(6), 1786–1787. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.003>

Duhoux, E. (1982). Mechanism of exine rupture in hydrated taxoid type of pollen. *Grana*, 21(1), 1–7. <https://doi.org/10.1080/00173138209427673>

Europeia, O. P. E. e o C. da U. (2008). Directiva 2008/50/CE do Parlamento Europeu do Conselho de 21 de Maio de 2008 relativa à qualidade do ar ambiente e ao ar mais limpo na Europa. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 1–44.

Galán, C., Ariatti, A., Bonini, M., Clot, B., Crouzy, B., Dahl, A., ... Sofiev, M. (2017). Recommended terminology for aerobiological studies. *Aerobiologia*, 33(3), 293–295. <https://doi.org/10.1007/s10453-017-9496-0>

Galveias, A., Arriegas, R., Calhau, I., Ramos, I., Antunes, C., & Costa, A. R. (2016). Pollen from plane trees: a potential cause of respiratory allergy in urban environments [P4/04]. In *Book of Abstracts: XIX National Congress of Biochemistry* (p. 80). University of Minho,

Guimarães.

Ghiani, A., Aina, R., Asero, R., Bellotto, E., & Citterio, S. (2012). Ragweed pollen collected along high-traffic roads shows a higher allergenicity than pollen sampled in vegetated areas. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 67(7), 887–894. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02846.x>

Gilles, S., Behrendt, H., Ring, J., & Traidl-Hoffmann, C. (2012). The Pollen Enigma: Modulation of the Allergic Immune Response by Non-Allergenic, Pollen-Derived Compounds. *Current Pharmaceutical Design*, 18(16), 2314–2319. <https://doi.org/10.2174/138161212800166040>

Gottardini, E., Cristofori, A., Cristofolini, F., Maccherini, S., & Ferretti, M. (2008). Ambient levels of nitrogen dioxide (NO₂) may reduce pollen viability in Austrian pine (*Pinus nigra* Arnold) trees - Correlative evidence from a field study. *Science of the Total Environment*, 402(2–3), 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.04.048>

Gruijthuijsen, Y. K., Grieshuber, I., Stöcklinger, A., Tischlera, U., Fehrenbach, T., Weller, M. G., ... Duschl, A. (2006). Nitration enhances the allergenic potential of proteins. *International Archives of Allergy and Immunology*, 141(3), 265–275. <https://doi.org/10.1159/000095296>

Guedes, A., Ribeiro, N., Ribeiro, H., Oliveira, M., Noronha, F., & Abreu, I. (2009). Comparison between urban and rural pollen of *Chenopodium alba* and characterization of adhered pollutant aerosol particles. *Journal of Aerosol Science*, 40(1), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2008.07.012>

Gwozdz, T., & Dorey, K. (2017). Western Blot. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 99–118). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00006-0>

Helander, M. L., Savolainen, J., & Ahlholm, J. (1997). Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 52(12), 1207–1214. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1997.tb02525.x>

Ibarrola, I., Arilla, M. C., & Martí, A. (2004). Identification of a polygalacturonase as a major allergen (Pla a 2) from *Platanus acerifolia* pollen, 1185–1191.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.02.031>

J. Delves, P., J. Martin, S., R. Burton, D., & M. Roitt, I. (2011). *Roitt's Essential Immunology* (12th ed.). Wiley-Blackwell. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90267-1](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90267-1)

J. Hunter, D., Frumjin, H., & Jha, A. (2017). Preventive Medicine for the Planet and Its Peoples. *The New England Journal of Medicine*, 1–3.

Liu, J. J., Sturrock, R., & Ekramoddoullah, A. K. M. (2010). The superfamily of thaumatin-like proteins: Its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Reports*, 29(5), 419–436. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0826-8>

Lu, S., Ren, J., Hao, X., Liu, D., Zhang, R., Wu, M., ... Wang, Q. (2014). Characterization of protein expression of *Platanus* pollen following exposure to gaseous pollutants and vehicle exhaust particles. *Aerobiologia*, 30(3), 281–291. <https://doi.org/10.1007/s10453-014-9327-5>

M. Hirst, J. (1945). An Automatic Volumetric Spore Trap. *Assessment*.

Majd, A., Chehregani, A., Moin, M., Gholami, M., Kohno, S., Nabe, T., & Shariatzade, M. A. (2004). The effects of air pollution on structures, proteins and allergenicity of pollen grains. *Aerobiologia*, 20(2), 111–118. <https://doi.org/10.1023/B:AERO.0000032950.12169.38>

Mimet, A., Pellissier, V., Quénel, H., Aguejdad, R., Dubreuil, V., & Rozé, F. (2009). Urbanisation induces early flowering: Evidence from *Platanus acerifolia* and *Prunus cerasus*. *International Journal of Biometeorology*, 53(3), 287–298. <https://doi.org/10.1007/s00484-009-0214-7>

Nowak, M., Szymanńska, A., & Grewling, Ł. (2012). Allergic risk zones of plane tree pollen (*Platanus* sp.) in Poznan. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 29(3), 156–160.

Resnik, D. B. (2012). *Environmental Health Ethics*. Cambridge University Press.

Ribeiro, H., Duque, L., Sousa, R., Cruz, A., Gomes, C., Esteves Da Silva, J., & Abreu, I. (2014). Changes in the IgE-reacting protein profiles of *Acer negundo*, *Platanus x acerifolia* and *Quercus robur* pollen in response to ozone treatment. *International Journal of Environmental Health Research*, 24(6), 515–527. <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.865716>

- Schultz, A. A., Schauer, J. J., & Mc, K. (2017). Allergic disease associations with regional and localized estimates of air pollution. *Environmental Research*, 155(October 2016), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.01.039>
- Sedghy, F., Sankian, M., Moghadam, M., Ghasemi, Z., Mahmoudi, M., & Varasteh, A. R. (2017). Impact of traffic-related air pollution on the expression of *Platanus orientalis* pollen allergens. *International Journal of Biometeorology*, 61(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00484-016-1186-z>
- Sedghy, F., Varasteh, A. R., Sankian, M., & Moghadam, M. (2018). Interaction between air pollutants and pollen grains: The role on the rising trend in allergy. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 6(2), 219–224.
- Sénéchal, H., Visez, N., Charpin, D., Shahali, Y., Peltre, G., Biolley, J. P., ... Sutra, J. P. (2015). A review of the effects of major atmospheric pollutants on pollen grains, pollen content, and allergenicity. *Scientific World Journal*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/940243>
- Shahali, Y., Pourpak, Z., Moin, M., Zare, A., & Majd, A. (2009). Impacts of air pollution exposure on the allergenic properties of Arizona cypress pollens. *Journal of Physics: Conference Series*, 151. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/151/1/012027>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Southern, E. M. (1975). Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments. *Journal of Molecular Biology*, 98, 503–517. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(75\)80083-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(75)80083-0)
- Suárez-Cervera, M., Asturias, J. A., Vega-Maray, A., Castells, T., López-Iglesias, C., Ibarrola, I., ... Seoane-Camba, J. A. (2005). The role of allergenic proteins Pla a 1 and Pla a 2 in the germination of *Platanus acerifolia* pollen grains. *Sexual Plant Reproduction*, 18(3), 101–112. <https://doi.org/10.1007/s00497-005-0002-4>
- Suárez-Cervera, M., Castells, T., Vega-Maray, A., Civantos, E., Del Pozo, V., Fernández-González, D., ... Seoane-Camba, J. A. (2008). Effects of air pollution on Cup a 3 allergen in *Cupressus arizonica* pollen grains. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 101(1), 57–

66. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60836-8](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60836-8)

Technology, B. B. (n.d.). *ELISA Handbook: Principle, Troubleshooting, Sample Preparation and Assay Protocols*.

Thien, F., Beggs, P. J., Csutoros, D., Darvall, J., Hew, M., Davies, J. M., ... Guest, C. (2018). The Melbourne epidemic thunderstorm asthma event 2016: an investigation of environmental triggers, effect on health services, and patient risk factors. *The Lancet Planetary Health*, 2(6), e255–e263. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(18\)30120-7](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30120-7)

Todo-Bom, A., Brandão, R., Nunes, C., Caeiro, E., Leitão, T., Oliveira, J. F., & Morais de Almeida, M. (2004). Allergenic airborne pollen in Portugal 2002-2004, 41–50.

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

Walker, J. M., & Walker, J. M. (2003). The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. *Basic Protein and Peptide Protocols*, 5–8. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-x:5>

World Health Organization Regional Office for Europe - Copenhagen. (2000). *Air Quality Guidelines for Europe*. (F. Theakston, Ed.) (2nd ed.).

Zhang, Q., Qiu, Z., Chung, K. F., & Huang, S. K. (2015). Link between environmental air pollution and allergic asthma: East meets West. *Journal of Thoracic Disease*, 7(1), 14–22. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2014.12.07>

Websites

[1] <https://jb.utad.pt/> (29/11/2019)

[2] <https://www.rpaerobiologia.com/dicionario-do-polen/platano> (27/11/2019)

[3] <https://lince.di.uevora.pt/polen/> (17/11/2019)

[4] <http://www.allergome.org/> (17/11/2019)

[5] <https://www.uniprot.org/> (24/11/2019)

[6] <https://www.uco.es/rea/> (13/11/2019)

[7] <https://www.bosterbio.com/> (*ELISA Handbook: Principle, Troubleshooting, Sample Preparation and Assay Protocols*) (13/11/2019)