

1. INTRODUÇÃO

1.1. AEROBIOLOGIA

A Aerobiologia é uma ciência relativamente jovem que teve origem no século XIX com os trabalhos de Louis Pasteur e de C. G. Ehrenberg. Progressivamente até ao início do século XX, são descobertas e descritas as partículas biológicas contidas no ar e as suas funções. Em 1873, Charles Blackley é o primeiro autor a mencionar a relação entre a “febre do feno” e o pólen no ar e a publicar um calendário polínico. De acordo com referências de vários autores (RODRÍGUEZ-RAJO, 2000; CLOT, 2003; MESA 2003; LACEY & WEST, 2006; DOCAMPO, 2008) o termo Aerobiologia foi introduzido pela primeira vez por Fred C. Meier em 1937, que a definiu como sendo “a ciência de origem multidisciplinar que se ocupa do estudo dos esporos dos fungos, grãos de pólen e bactérias presentes na atmosfera”. Philip Gregory é considerado o fundador, o “pai” da Aerobiologia moderna na sequência da publicação do livro “Microbiology of the Atmosphere” em 1961 (LACEY & WEST, 2006).

Actualmente, pode-se definir a Aerobiologia como *uma ciência multidisciplinar que se ocupa do estudo dos organismos e material biológico ou bioaerossóis que são transportados, de uma forma passiva, através da atmosfera, prestando uma especial atenção à fonte de produção desses organismos, à sua libertação para a atmosfera, dispersão, deposição e impacto nos sistemas vegetais, animais e humanos*. A Aerobiologia lida não somente com muitos tipos diferentes de organismos mas também com os seus produtos, incluindo vírus, células ou esporos de bactérias, actinomicetos e fungos e metabolitos associados, nomeadamente endotoxinas, glucanas e micotoxinas; esporos de briófitas e pteridófitas; pólenes de plantas superiores; protozoários, ácaros e pequenos insectos, seus fragmentos e resíduos fecais; proteínas de soro e excreções de pássaros; proteínas urinárias de animais; partículas orgânicas nomeadamente proteínas libertadas a partir de células vegetais ou animais durante o processamento industrial e produtos de processos biotecnológicos, sobretudo enzimas. São assim excluídos do seu campo de intervenção as aves e grandes insectos pois estes podem determinar a sua própria direcção de voo e não são transportados de forma passiva pelo vento (LACEY, 1994).

Os estudos aerobiológicos são complexos e necessitam da colaboração de especialistas de numerosas disciplinas: a Aerobiologia é uma ciência de integração, com ligações a muitas outras ciências, tais como, botânica, ecologia, meteorologia, agricultura e alergologia. (ISARD & GAGE, 2000; EMBERLIN, 2005), podendo-se considerar a ecologia do ar.

As informações aerobiológicas têm aplicações em diversos domínios como na saúde (alergias, transmissão de infecções), na agricultura e na silvicultura (em particular na fitopatologia), no estudo das alterações climáticas (climatologia), na ecologia dos ecossistemas terrestres e aquáticos, na paleoecologia, na conservação do património cultural (edifícios, obras de arte), na arqueologia, no estudo de fluxo de genes (fenómenos evolutivos), na biossegurança (estudo do fluxo de pólen de organismos geneticamente modificados e da dispersão de agentes patogénicos), na biometeorologia, na microbiologia, na qualidade do ar interior, na biodeterioração e nas ciências forenses.

1.1.1. Aerobiologia em Portugal

Em Portugal, os primeiros estudos efectuaram-se em Sacavém (1949-1950), Lisboa (1955) e Porto (1959-1960 e 1969-1970) por PINTO DA SILVA (1955, 1989) com um colector Durham. Os primeiros estudos com um colector, assente na tecnologia delineada por *Hirst*, efectuaram-se em Coimbra (PAIVA *et al.*, 1988). Em Évora, desde 1988 que se vem analisando o conteúdo de pólen na atmosfera (BRANDÃO & LOPES 1990a,b, 1992, 1996), inicialmente com um colector Cour e Durham e, posteriormente, por um colector de tipo *Hirst*. Estes autores concluíram que os grãos de pólen desempenham um papel importante no desencadeamento da sintomatologia da doença atópica nesta área (BRANDÃO & LOPES, 1990a;1990b; 1991; 1992).

Em 2000-2001 estabeleceu-se a primeira rede nacional em Aerobiologia baseada na metodologia *Cour*, e em 2002 é criada a Rede Portuguesa de Aerobiologia (RPA) sob os auspícios da Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica (SPAIC), baseada na metodologia *Hirst*. A metodologia *Hirst* é a metodologia normalizada para a monitorização de pólen e esporos de fungos atmosféricos presentes no ambiente exterior, e é a única recomendada pela IAA- International Association of Aerobiology e organizações congéneres (CAEIRO *et al.*, 2007). A RPA encontra-se integrada numa rede mais ampla que funciona a nível europeu – *European Aeroallergen Network* – EAN e transfere parte dessa informação do Centro de coordenação para o Banco de Dados de Pólen Europeu – *European Pollen Data Bank* – situado na Universidade de Viena, Austria (BRANDÃO *et al.*, 2003; BRANDÃO, 2006).

A monitorização baseia-se na identificação e quantificação dos grãos de pólen dos vários *taxa* ao microscópio óptico. Sabe-se que os alérgenos polínicos também ocorrem no ar em partículas

mais pequenas que o pólen, em geral sob a forma de diversas formas proteicas que nalguns indivíduos atópicos funcionam como antigénios e, tal conhecimento tem levado, nos últimos anos, ao desenvolvimento de novos métodos de detecção e quantificação de aeroalergenos nomeadamente através de imunoensaios (CABRERA, 2002, SPIEKSMAN, 1995; GARRIDO-LESTACHE *et al.*, 2002, CONDE HERNÁNDEZ *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2008). No entanto, a monitorização polínica continua a ser o método de referência para validação de outras tecnologias.

1.1.2. Aerobiologia de uma Região

O conhecimento das concentrações de pólen atmosférico numa determinada zona geográfica é de grande interesse, quer para os doentes alérgicos como para os seus médicos, em ordem a estabelecer correlações entre as ditas concentrações e os sintomas de rinites e/ou asma, e desta forma conseguir um melhor controlo destas doenças (DE NUNTIIS *et al.*, 2002; ABREU *et al.*, 2003). As concentrações de pólen no ar, assim como as repercussões nos que sofrem de polinose, ainda não foram bem estudadas em Portugal. Sabe-se que existe uma correlação evidente entre surtos de alergia respiratória e quantidades de pólen na atmosfera (SIBBAD & STRACHAN, 1994) e que o conhecimento das estações polínicas, a identificação dos tipos polínicos presentes na atmosfera e a determinação das suas concentrações atmosféricas são informações benéficas para os clínicos e doentes que sofrem de polinose. Por esta razão, em muitos países, têm-se efectuado calendários polínicos anuais. O calendário polínico apresenta os diferentes tipos de pólen que se encontram no ar de uma região e o período de tempo que estes estão presentes na atmosfera. Deste modo, é útil na identificação de agentes etiológicos da alergia a tipos polínicos particulares sazonais. A análise da correlação entre as manifestações clínicas e o calendário polínico pode levar ao rápido e correcto diagnóstico etiológico e poderão ser tomadas medidas preventivas. O conhecimento do pico de polinização e o período de polinização de cada tipo de pólen permite uma melhor correlação entre o estudo alergológico e a sintomatologia apresentada pelos doentes permitindo um tratamento farmacológico ou tratamento de hiposensibilização mais correcto.

Alguns investigadores assumem que existe um padrão básico de ocorrência de pólen no ar (cíclico ou estável) que é, de alguma forma, independente das condições externas, enquanto outros assumem a existência de flutuações que são fundamentalmente causadas por factores meteorológicos (SPIEKSMAN & TONKELAAR, 1986). Segundo LATORRE (1999), a concentração de pólen no ar e

o tempo que esse pólen permanece no ar depende da fenologia floral das espécies emissoras e das condições meteorológicas durante o período de polinização. A variabilidade interanual da concentração de pólen atmosférico resultará, segundo o mesmo autor, da actuação de factores endógenos e/ou factores ambientais.

Resulta deste facto que, a composição polínica da atmosfera de uma região depende de vários factores, entre os quais se encontram aqueles que afectam:

1) a emissão, a libertação do pólen pelas várias fontes: flora, vegetação e condições ambientais (a humidade, a precipitação, a temperatura e o vento) que afectam as distintas espécies vegetais;

2) o transporte: situação geográfica da localidade e condições meteorológicas;

3) a dispersão, o transporte e a sedimentação: a estabilidade atmosférica, a direcção e velocidade do vento e a precipitação; e

4) a captação dos grãos de pólen: metodologia utilizada e lugar de localização do captador.

Cada processo aerobiológico (emissão, dispersão, transporte e sedimentação) está ligado a diferentes fenómenos biológicos que são controlados por diferentes factores (LATORRE, 1997; FRENGUELLI, 2002), o que torna o sistema de análise bastante complexo.

Há ainda que atender que a composição do espectro polínico de uma localidade é um reflexo da paisagem que está em seu redor, existindo uma grande influência das plantas que se encontram próximas do colector.

1.1.3. Métodos de Amostragem Aerobiológica

Para o estudo de partículas transportadas pelo ar são vários os métodos que se podem utilizar, dependendo a sua escolha do trabalho que se pretende realizar. A tabela 1.1 resume os diferentes métodos de amostragem aerobiológica (captadores ou colectores).

Tabela 1.1: Resumo dos diferentes métodos de amostragem aerobiológica (Adaptado de BELMONTE & ROURE, 2002).

MÉTODOS DE AMOSTRAGEM AEROBIOLÓGICA		
Amostradores de precipitação	Precipitação gravimétrica	Placas de Petri Captador Durham Captador Tauber
	Precipitação electrostática	
	Precipitação térmica	
Amostradores de impacto	Impacto por sucção	Captador Hirst
	Impacto em cascata	Captador Andersen
	Amostradores inerciais e ciclónicos	Captador Rotorod Captador Ciclónico
Amostradores de filtração	Filtros sólidos	Filtros de Fibra Captador Cour Filtros por membrana Filtros por cassettes
	Filtrado em meio líquido	Captador McLeod Multi-Stage Liquid Impinger
Amostradores biológicos	Técnicas de biologia molecular	
	Técnicas imunológicas	

Para as monitorizações de grãos de pólen e de esporos de fungos (bioaerossóis desencadeantes de doenças respiratórias alérgicas) presentes na atmosfera utiliza-se um colector de impacto por sucção do tipo *Hirst* (HIRST, 1952) sendo, actualmente, as versões comerciais Burkard 7-day Volumetric Spore Trap (Burkard Manufacturing CO, UK) e Lanzoni VPPS model 2000 (Lanzoni CO., Bologna, Italy) as dominantes (Figura 1.1). Estes equipamentos apresentam os requisitos mínimos recomendados para a execução metodológica deste tipo de análises (Working Group on Aerobiology,

2010; *Aerobiologia* 1995, 11: 69-70). Todas as redes de monitorização de bioaerossóis envolvidas na *European Aeroallergen Network/ European Pollen Information* (EAN/ EPI), que são cerca de 26 redes representadas por 23 países, utilizam colectores deste tipo (GALÁN, 2010).



Figura 1.1: Método volumétrico de *Hirst. Burkard Seven Day Volumetric Spore-trape*®.

Para a preparação das amostras e contagem, utiliza-se, geralmente, como substância adesiva a vaselina ou solução de silicone; como meio de montagem (tendo em conta que este deve ter uma qualidade óptica, estabilidade e compatibilidade com o meio de captura), utiliza-se uma grande variedade de meios de montagem, entre os quais a solução de glicerino-gelatina. Ao meio de montagem é importante adicionar fenol para evitar o desenvolvimento microbiano. No caso de se pretender monitorizar grãos de pólen, é importante corar as amostras, e o corante mais frequentemente utilizado é a fucsina básica (MANDRIOLI *et al.*, 1998).

No que diz respeito à análise da amostra, apenas uma fracção é analisada, a qual para ser considerada representativa, deve corresponder à observação de pelo menos 10% da superfície da lâmina, sendo a observação e identificação das partículas feita ao microscópio óptico com uma ampliação de 400x (*Aerobiologia* 1995, 11: 69-70). Para a análise da amostra (identificação e contagem dos grãos de pólen) podem ser usados muitos métodos diferentes, sendo os mais comuns: método das linhas horizontais, método das linhas verticais, método de campo tangente e método de campo aleatório (Figura 1.2) (MANDRIOLI *et al.*, 1998). Das 26 redes envolvidas na EAN/ EPI, 22 redes (92,3%) usam os dois primeiros métodos de leitura: 16 redes usam o método das linhas horizontais e 8 redes o

método das linhas verticais. Quanto ao número de linhas horizontais lidos por lâmina, há uma grande variedade, variando entre 5 a 2 linhas por lâmina; e no caso do método de leitura por linhas na vertical, duma maneira geral analisam-se 12 linhas por lâmina (GALAN, 2010).

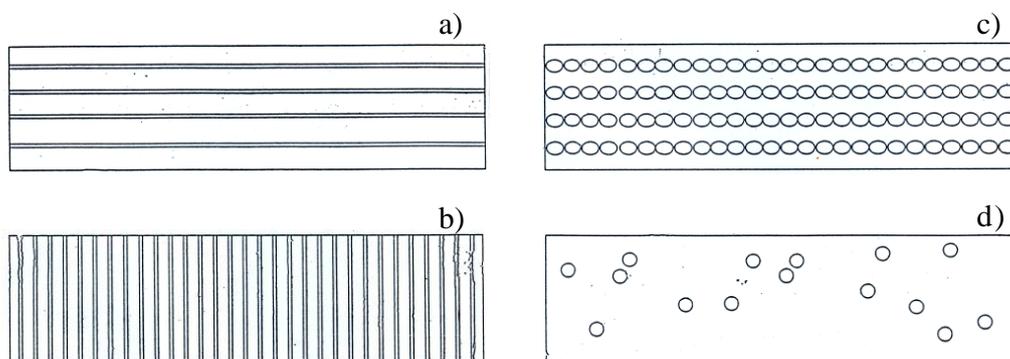


Figura 1.2: Tipos de leitura das amostras: a) método das linhas horizontais, b) método das linhas verticais, c) método de campo tangente e d) método de campo aleatório.

1.2. O PÓLEN

1.2.1. O Pólen, Polinização e Estrutura

Os **grãos de pólen** (do latim *pollen-inis* que significa pó muito fino) são estruturas indispensáveis à reprodução das plantas *Spermatophyta* e representam, no ciclo de vida das plantas, o **gametófito masculino** ou **microgametófito**, cuja função é transportar os gâmetas masculinos e fertilizar os óvulos. Os grãos de pólen derivam de um processo meiótico das células-mãe dos grãos de pólen e quando maduros, geralmente, consistem numa **célula bi-** ou **trinucleada** envolvida por uma parede que tem uma importante função de protecção do microgametófito na sua jornada entre as flores masculina e feminina.

Nalgumas espécies de plantas o pólen realiza a sua função na mesma flor ou na mesma planta que o formou – plantas **autogâmicas**, porém na grande maioria das espécies o pólen só é viável se alcança o gâmeto feminino (oosfera) de outra planta da sua espécie – plantas **alogâmicas**. O transporte do grão de pólen desde o órgão onde se formou até ao órgão feminino da flor denomina-se de **polinização** e pode-se efectuar de diversas maneiras, que são características de cada espécie. A polinização pode efectuar-se pelo vento – plantas **anemófilas**, e/ou por animais – plantas **zoogâmicas** (se por insectos: abelhas, escaravelhos, borboletas, etc.) – plantas **entomófilas**, ou pela água – plantas **hidrófilas**.

O processo de polinização requer que os grãos de pólen sejam células resistentes, já que poderão ser submetidos a condições ambientais adversas que poderiam provocar o colapso e dessecação do seu conteúdo celular, alterando-o e tornando-o inviável. Como adaptação, no geral, os grãos de pólen encontram-se envolvidos por uma parede mais externa, mais ou menos espessa, a **exina** que é constituída por uma substância muito particular e invulgar, muito resistente, das mais inalteráveis da natureza, a **esporopolenina**. E por uma parede mais interna, fina, a **intina**, constituída por celulose e pectina, semelhante a uma parede celular.

A **exina** é composta por duas camadas, uma camada exterior esculpada, com numerosos micropóros, bem como grandes aberturas: poros e/ou colpos, a **sexina**, e uma camada mais interior que não é esculpada, mais homogénea, mas impermeável, a **nexina** que cobre a intina. A seguir à intina encontra-se o plasmolema que é a membrana celular que envolve citoplasma ou protoplasma do grão de pólen.

A **sexina**, por sua vez, pode ser separada em subcamadas: um tecto exterior mais ou menos grosso que pode ser contínuo ou não, o **tectum** (tecto), uma camada basal que termina na nexina e

um segmento central composto por colunas (**columelas**), ou *baculae* (**báculo**), que formam o *infratectum*, separando as duas (Figura 1.3). A superfície exterior da sexina pode ter uma variedade de projecções e marcas de superfície – **elementos suprategais** (Figura 1.4).

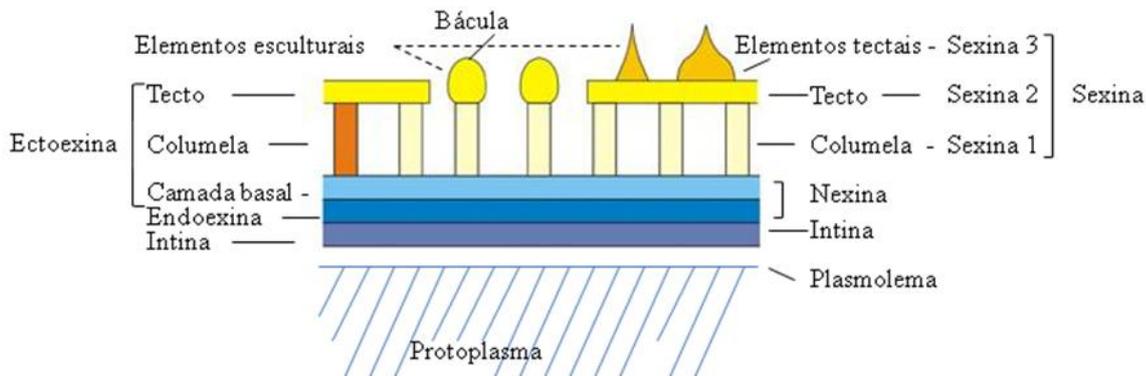


Figura 1.3: Estratificação da parede do grão de pólen (esporoderme) segundo dois sistemas diferentes (Adaptado e modificado de PUNT *et al.*, 2007).

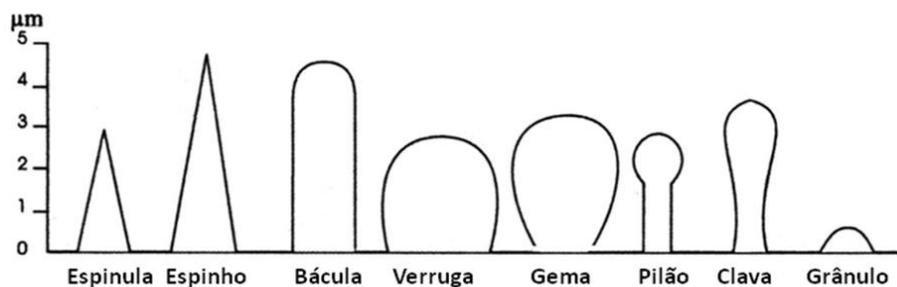


Figura 1.4: Elementos esculturais em secção transversal (Adaptado e modificado de SÁENZ, 2004).

Os elementos esculturais mais ou menos desenvolvidos na exina conferem uma **ornamentação** ou escultura à parede do grão de pólen.

As diferentes esculturas na superfície dos grãos de pólen resultam da arquitectura da sexina. No tipo estrutural “*columellate*”, típico do pólen das angiospérmicas, a sexina é composta de pequenas colunas dispostas radialmente que assentam na nexina e denominam-se *columelas*, suportando um *tectum* que pode ser perfurado ou esculpado em de um modo característico. O *tectum* pode estar completo (grãos **tectados**), parcialmente dissolvido (grãos **semitectados**) ou completamente ausente (grãos **intectados**) [Figura 1.5].

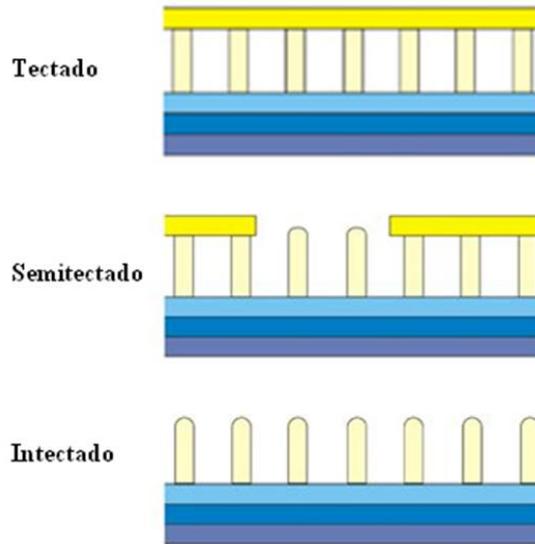


Figura 1.5: Diagrama dos diferentes arranjos do *tectum* (Adaptado de PUNT *et al.*, 2007).

Nos tipos intectados, a exina diz-se **baculada** quando os elementos supratectais são báculos; **claviforme** quando são clavas; **equinada**, com espinhos; **gemada**, **escábrida**, áspero, escabroso ou manchado e **verrugosa**, com verrugas ou irregular (Figura 1.4). Estas projecções podem ser distintivas e imediatamente evidentes, ou podem ser muito subtis e difíceis de ver, requerem cuidadosa observação sob elevada resolução com óleo de imersão. Muitas compostas (ex.: *Ambrosia*) têm espinhos óbvios. Os da *Ambrosia* são pequenos e largos na base, enquanto os do *Helianthus* (girassol) são longos. Os pólenes de Taxodiaceae são pólenes semelhantes ao do *Cupressus* contudo possuem uma simples, irregular projecção uma “*papilla*”.

Nalguns tipos tectados e semitectados a parte superior das columelas estão ligadas em duas direcções para formar um padrão **reticulado** (como uma rede ou malha). As paredes do reticulo são chamadas de **muros** (lat. *muri*) e os espaços entre as paredes de **lumen**. Um padrão sexina **estriada** (ex.: *Acer*) é formado por uma união lateral de columelas (lat. *columellae*) e os muros correm paralelos uns aos outros. A situação intermédia, é chamada de padrão **rugulado** (padrão irregular, ex.: *Acer negundo*). O *tectum*, por vezes, tem perfurações de várias formas ou tamanhos, e as esculturas são descritas com base nas suas formas da mesma maneira os tipos infra-TECTAL (clava, báculo, etc.). Os grãos de pólen de *Populus* apresentam uma textura granular e irregular. Um pólen com uma superfície macia, regular, como o das gramíneas, é chamado de **psilado** (Figura 1.6).

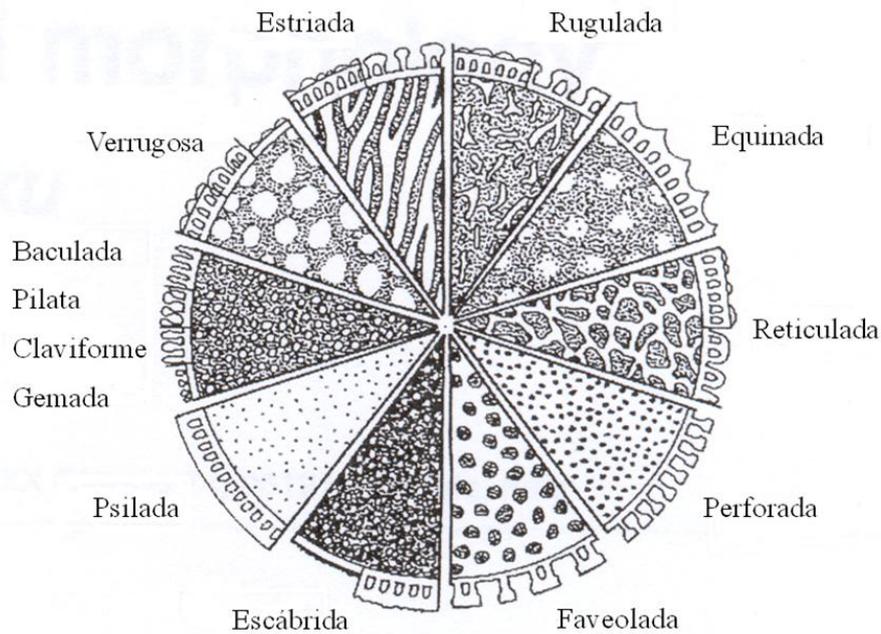


Figura 1.6: Tipos de esculturas da sexina: as áreas mais altas estão a claro e as áreas mais baixas estão a escuro. Por vezes o mesmo tipo de escultura é produzido por diferentes estruturas da sexina (tectado, semitectado, intectado) (Adaptado de FRENGUELLI *et al.*, 1991).

Cada espécie elabora uma escultura distinta na superfície dos grãos de pólen, mas existem muitas outras características morfológicas que são úteis para a análise da classificação do pólen. A combinação da estrutura e ornamentação da superfície, juntamente com a forma, a simetria, o tamanho, o número e distribuição das aberturas (poros e/ou colpos) permitem reconhecer a proveniência floral desses grãos de pólen com maior ou menor precisão (FELBER & CLOT, 2003; BELMONTE *et al.*, 2001; BELMONTE & ROURE, 2002). O conjunto das características de um pólen é constante para cada planta e é possível identificar com mais ou menos precisão de que *taxon* provem o pólen. É necessário o uso da palavra *taxon* (que significa qualquer unidade de determinação dentro de um sistema hierárquico de categorias) porque nem sempre se pode identificar de que espécie provem o pólen; em muitos casos a precisão chega só ao nível do género (grupo de espécies, ex.: *Plantago* sp.), família (grupo de géneros, ex.: Poaceae), ou inclusive a um grupo de famílias ou categorias superiores (ex.: Chenopodiaceae-Amaranthaceae).

1.2.2. Morfologia dos Grãos de Pólen

Número de Grãos de Pólen

Em geral, os grãos de pólen são formados em grupos de quatro, resultado da divisão meiótica de uma única célula – célula mãe dos grãos de pólen. Frequentemente estas quatro células tornam-se completamente livres quando atingem a maturidade altura em que são libertados, esses grãos denominam-se **mónadas**. Em certos géneros ou famílias, eles são libertados aos pares, formam **díadas**, ou permanecem ligados formando **tétradas** (ex.: Ericaceae e Typhaceae). Também podem ocorrer em agregações com um maior número de grãos de pólen sendo denominados por **políadas** (ex.: algumas espécies de *Acacia* e certas orquídeas) [Figura 1.7].

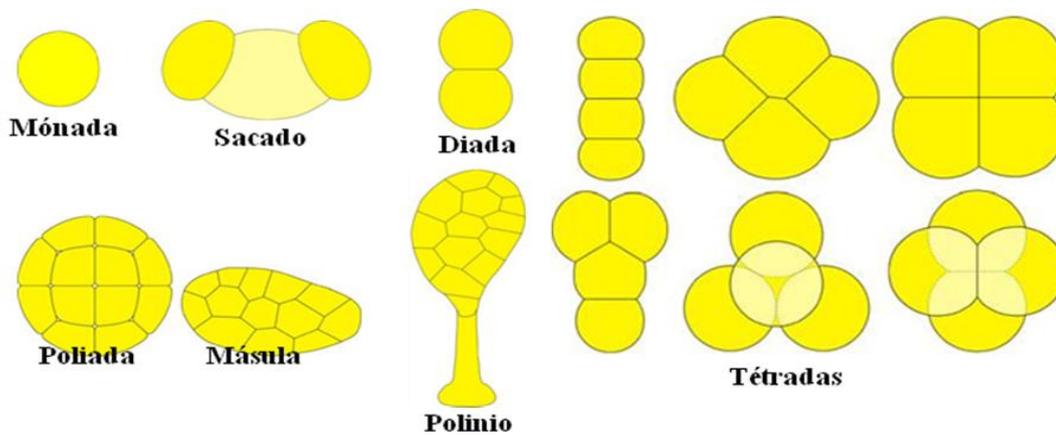


Figura 1.7: Tipos de Pólen (Adaptado e modificado de PUNT *e tal.*, 2007).

Polaridade

Cada grão de pólen tem uma polaridade porque exibem áreas opostas ou pólos como uma consequência da posição original no interior da tétrada. O eixo polar é uma linha imaginária que atravessa o grão de pólen e une os pólos opostos – **pólo proximal** e **pólo distal**. O pólo proximal é o que se encontra próximo do centro da tétrada e o distal é o que está mais afastado. O eixo equatorial é a linha que corre em redor do grão de pólen na zona do equador e é perpendicular ao eixo polar. Estes eixos são importantes na **orientação** dos grãos de pólen e estruturas, tais como as aberturas. Se as áreas dos dois pólos são semelhantes, o grão diz-se **isopolar**, enquanto se tem características diferentes é **heteropolar**. Por vezes, não se consegue identificar as duas áreas polares, neste caso, o grão de pólen é apolar (Figura 1.8 e 1.9).

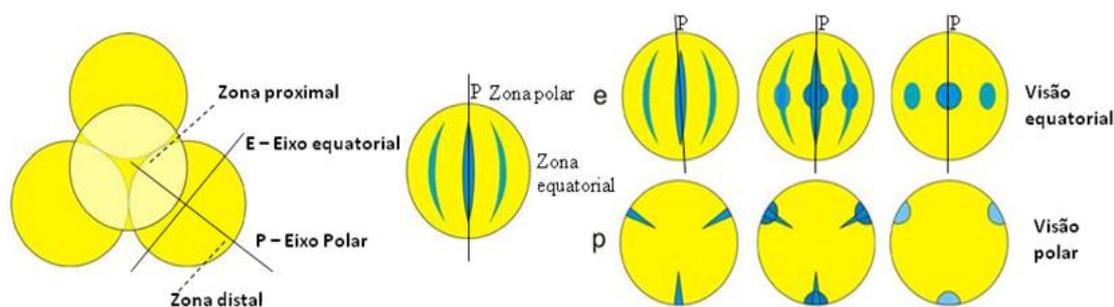


Figura 1.8: Polaridade [Adaptado e modificado de BELMONTE & ROURE, 2002)].

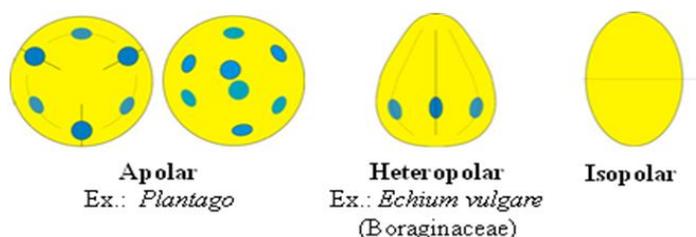


Figura 1.9: Classificação dos grãos de pólen quanto à polaridade [Adaptado e modificado de PUNT *et al.*, 2007)].

Simetria

Quanto à simetria um grão de pólen pode ser:

- **Bissimétrico:** apresenta dois planos de simetria;
- **Radiossimétrico:** apresenta três ou mais planos de simetria; ou
- **Assimétrico:** não apresenta nenhum plano de simetria.

Tamanho

O tamanho dos grãos de pólen varia de 2 a 5 μm a cerca de 200 a 300 μm . Na maioria dos grãos de pólen encontrados no ar o seu tamanho varia entre 10 a 80 μm . Por exemplo, os pólenes de *Urtica* e *Morus* são pólenes pequenos, 10 a 15 μm , enquanto que os pólenes de cereais como o milho e de algumas coníferas, como *Abies* e *Pseudotsuga*, são pólenes muito grandes, podem ter mais de 100 μm . Certos pólenes entomófilos tais como de abóbora (Cucurbitaceae) podem atingir os 250 μm .

Normalmente para classificar os grãos de pólen quanto ao tamanho utilizam-se os seguintes grupos:

- **Muito pequeno**, < 10 μm ;
- **Pequeno**, 10-24 μm ;
- **Médio**, 25-49 μm ;
- **Grande**, 50-99 μm ;
- **Muito grande**, 100-200 μm ;
- **Gigante**, >200 μm .

Forma

Os grãos de pólen são estruturas tridimensionais e, geralmente, são elípticos (ovóides) ou esféricos, mas existem também com outras formas. Por exemplo, os pólenes que têm dois sacos polínicos ou vesículas de cada lado do grão de pólen [ex.: o pólen de pinheiro (*Pinus*)], outros têm forma de “bola” (ex.: Chenopodiaceae) ou triangular (ex.: Myrtaceae), ou mesmo forma de “cunha” (ex.: Cyperaceae). Os poros nos grãos de pólen actuam como pontos na superfície do grão de pólen onde a exina forma um ângulo, dando ao pólen uma forma triangular, quadrangular, ou poligonal dependendo do número de poros. O pólen de *Tilia* é excepção, os seus poros ocupam os lados planos de uma forma um tanto triangular, em vez dos cantos. No caso do pólen de *Artemisia*, a exina invagina um pouco nos póros, salientando-se.

O grau de alongação dos grãos de pólen elípticos pode ser usado na identificação. ERDTMAN (1952) e KAPP (1969) sugeriram a razão entre os diâmetros do eixo polar (P) e equatorial (E), o índice P/E.

Os seguintes termos são utilizados para descrever ou classificar o grão de pólen quanto à forma (Figura 1.10), dependendo do índice P/E:

- **perprolado** (ligeiramente alongado), $P/E > 2,00$;
- **prolado** (ligeiramente alongado), $P/E = 1,34-2,00$;
- **subprolado**, $P/E = 1,15-1,33$;
- **prolado esferoidal**, $P/E = 1,01-1,14$;
- **esférico**, $P/E = 1$;
- **oblado esferoidal**, $P/E = 0,89-0,99$;
- **suboblado**, $P/E = 0,76-0,88$;
- **oblado** (ligeiramente achatado), $P/E = 0,50-0,75$;
- **peroblado** (muito achatado), $P/E < 0,5$.

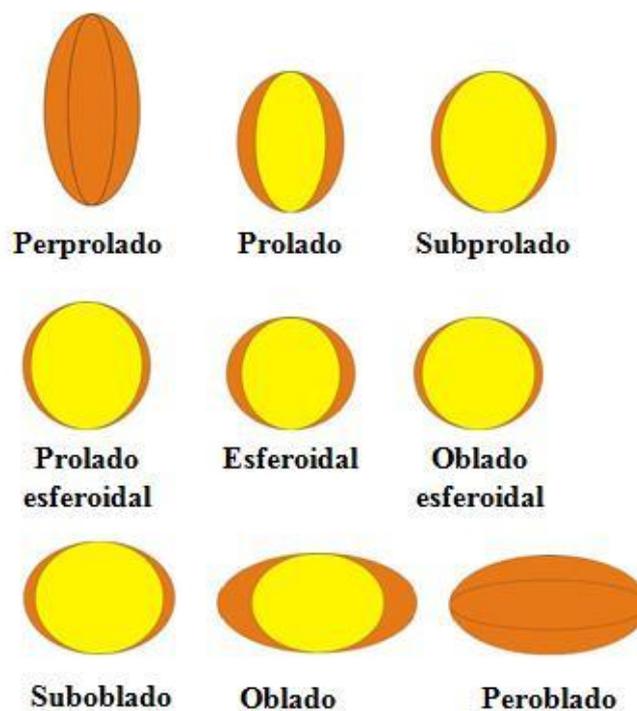


Figura 1.10: Formas do pólen segundo o índice P/E (Adaptado e modificado de PUNT *et al.*, 2007).

Aberturas

A maioria dos grãos de pólen possui aberturas que não são mais do que regiões especializadas da esporoderme que actuam como pontos de saída por onde o tubo polínico emerge quando da germinação num estigma compatível. As aberturas e os micropóros provavelmente também actuam como vias para a transferência de água e outras substâncias nomeadamente para a eluição de proteínas alergénicas, que podem ter funções enzimáticas e funções de sinal de reconhecimento na indução do processo de fertilização. Geralmente, são áreas em que a exina é fina ou não existe, com uma ornamentação e/ou estrutura diferente da restante.

Existem três tipos de aberturas (Figura 1.11) e denominam-se de *pori* (poros), *colpi* (colpos) e *sulci* (sulcos). Os *colpi* são mais primitivos que os *pori* e são alongados, como sulcos, com extremidades pontiagudas: a razão entre o diâmetro longitudinal e transversal é superior a dois. Os *sulci* são aberturas alongadas, têm a mesma forma que os *colpi* mas diferem na orientação, os *sulci* são essencialmente aberturas latitudinais enquanto os *colpi* são essencialmente aberturas longitudinais. Os *pori* são geralmente isodiamétricos (circulares) ou ligeiramente alongados (elípticos) com terminações arredondadas: a razão entre o diâmetro longitudinal e transversal é inferior a dois.

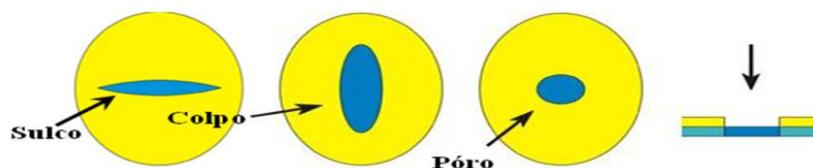


Figura 1.11: Tipos de aberturas (Adaptado e modificado de PUNT *et al.*, 2007).

Sem ter em conta a posição das aberturas, os grãos de pólen são denominados de **porados** quando têm somente *pori*; **colpados** com somente *colpi*; **colporados** quando na mesma abertura têm ambos, *colpi* e *pori*. Os grãos de pólen com *colpi* e *colpi+pori* são raros e denominam-se por **heterocolpados**.

Os grãos de pólen podem ser divididos em grupos com base no número, posição e características das aberturas. O número de aberturas varia de 0 a 40 ou mais e é indicado pelo colocação dos prefixos **mono-**, **di-**, **tri-**, **tetra-**, **penta-**, **hexa-**, e **poli-** (mais de seis aberturas), a colpado, porado e colporado. Os membros da família das gramíneas são invariavelmente monoporados. Os grãos triporados são talvez os mais comuns (ex.: *Parietaria*, *Betula*, *Corylus*, *Cannabaceae*), embora ocasionalmente esses grãos também possam ocorrer como tetraporados. Pólens sem qualquer tipo de abertura denominam-se **inaperturados** (ex.: *Cupressus*, *Populus* e *Pinus*). Se os *pori* ou *colpi* se encontram em redor do equador é usado o prefixo **zono-** (ou **stephano**) (ex.: *Ulmus*), enquanto se estiverem distribuídos por toda a superfície isso é indicado pelo prefixo **panto-** [ex.: *Plantago* (6 a 11 póros), *Chenopodiaceae* e *Amaranthaceae* (20 a 80 póros)]. O prefixo **axi-** indica que as aberturas se encontram localizadas no ou próximo do pólo (Figura 1.12).

	DI-		TRI-		TETRA-		PENTA-		HEXA-		Poli-	
	polar	eq.	polar	eq.	polar	eq.	polar	eq.	polar	eq.	polar	eq.
ZONOPORADO	 e.g. <i>Colchicum</i>	 e.g. <i>Betula</i>	 e.g. <i>Alnus, Ulmus</i>									
ZONOCOLPADO	 e.g. <i>Tofieldia</i>	 e.g. <i>Acer</i>	 e.g. <i>Hippuris</i>	 e.g. <i>Labiatae, Rubiaceae</i>								
ZONOCOLPORADO		 e.g. <i>Parnassia</i>	 e.g. <i>Rumex</i>	 e.g. <i>Viola</i>	 e.g. <i>Sanguisorba</i>	 e.g. <i>Utricularia</i>						
PANTOPORADO		 e.g. <i>Urtica</i>	 e.g. <i>Plantago</i>			 <i>Chenopodiaceae</i>						
PANTOCOLPADO			 e.g. <i>Ranunculaceae</i>		 e.g. <i>Spergula</i>	 e.g. <i>Polygonum amphibium</i>						
PANTOCOLPORADO			 e.g. <i>Rumex</i>		 e.g. <i>Polygonum raii</i>							

Figura 1.12: Classificação dos tipos polínicos segundo o número e posição das aberturas (Adaptado de MOORE & WEBB, 1978).

Por vezes, dois ou mais *colpi* podem estar fundidos nos pólos ou noutro lado, esses grãos denominam-se **sincolpados** (Figura 1.13). Outros pólenes, como nas Compositae Liguliflorae, trizonocolporados ou trizonoporados, têm sistemas de aberturas ocultos por grandes lacunas (*lacunae*) na sexina, separadas por elevados cumes equinados. Este tipo denomina-se **fenestrado** (Figura 1.14).

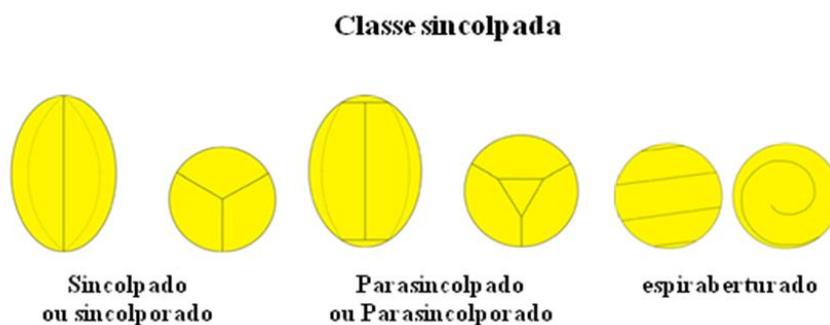


Figura 1.13: Classe sincolpada (Adaptado de PUNT *et al.*, 2007).

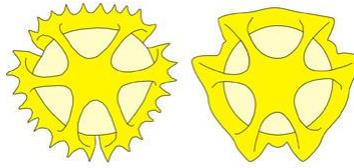


Figura 1.14: Pólen fenestrado de *Taraxacum* (Compositae Liguliflorae) [Adaptado e modificado de PUNT *et al.*, 2007].

As áreas no grão de pólen que estão entre as aberturas (Figura 1.15) denominam-se de **mesocolpium**, se estão entre dois *colpi*, ou **mesoporium**, se entre dois *pori* (visão equatorial); de **apocolpium**, se estão entre *colpi*, e de **apoporium**, se entre *pori* (visão polar).

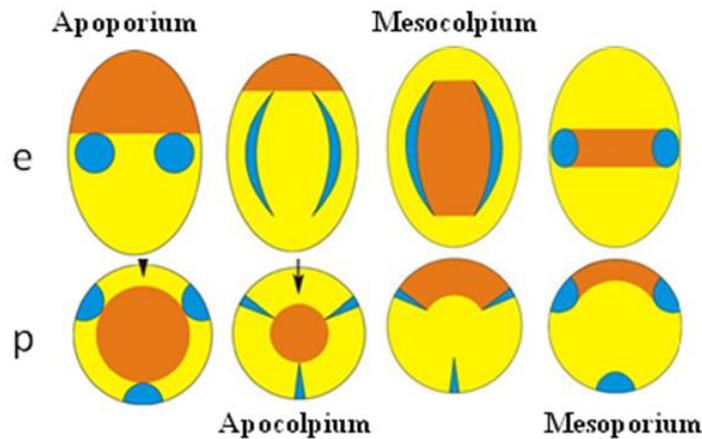


Figura 1.15: Denominação das áreas entre as aberturas (Adaptado de PUNT *et al.*, 2007).

A exina frequentemente mostra uma estrutura ligeiramente alterada na proximidade das aberturas. Quando isto acontece, a abertura diz-se ser **debruada**. Um súbito espessamento ou estreitamento da sexina em redor do *porus* é chamado de **annulus**, e em redor de um *colpus* de **margo**. O espessamento da nexina em redor da endoabertura ou por baixo do bordo de uma ectoabertura denominam-se **costae** (Figura 1.16).

Nalguns grãos de pólen as duas camadas da exina separam-se uma da outra na proximidade das aberturas. A cavidade então formada é vulgarmente encontrada em redor dos *pori* e chama-se **vestibulum**. Outros grãos têm na parte central da membrana de abertura a sexina mais grossa isto ocorre no corpo principal do grão de pólen. Este espessamento no centro é denominado por **operculum**. Um **aspis** é um engrossamento da exina em redor do poro, como um escudo. O engrossamento da intina sob o poro é chamado de **oncus**. A banda em arco entre os poros, é chamada

de *arcus* embora possa parecer fazer parte da porção interior dos grãos, é sexina espessa que forma um cume ao longo da superfície do grão (Figura 1.16 e 1.17). Já o pólen da planta *Artemisia* possui uma cavidade entre as duas camadas da exina que se estende até à margem do colpo onde as camadas de encontram e denomina-se por *cavea* (Figura 1.16). A maioria dos grãos de pólen pertencentes à família Pinaceae são grãos *sacados*, pois possuem sacos aéreos que resultam da separação da sexina da nexina (Figura 1.18.).

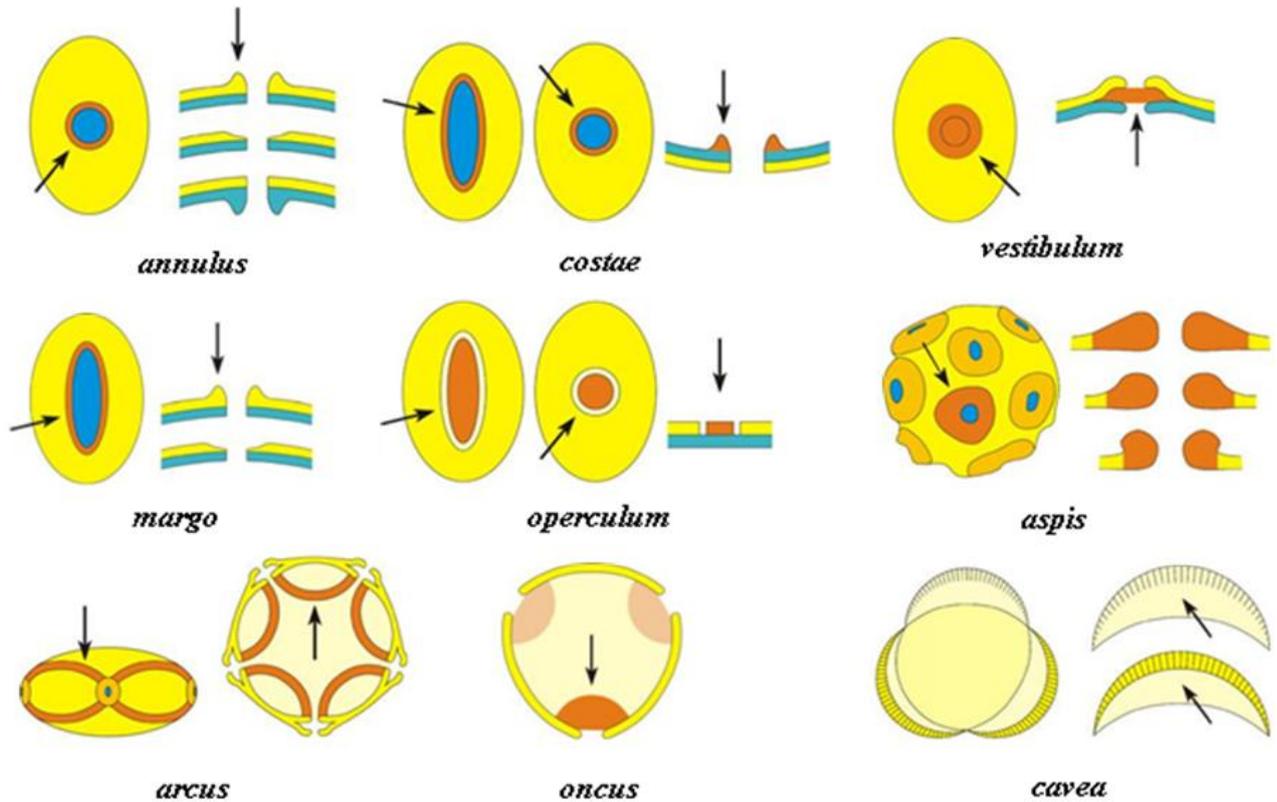


Figura 1.16: Estruturas associadas às aberturas dos grãos de pólen resultantes da modificação da exina (Adaptado de PUNT *et al.*, 2007).

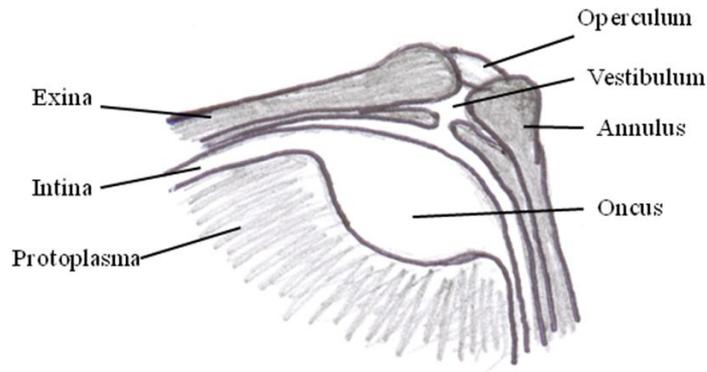


Figura 1.17: Corte transversal de um poro de *Betula* ou *Alnus* com estruturas associadas.

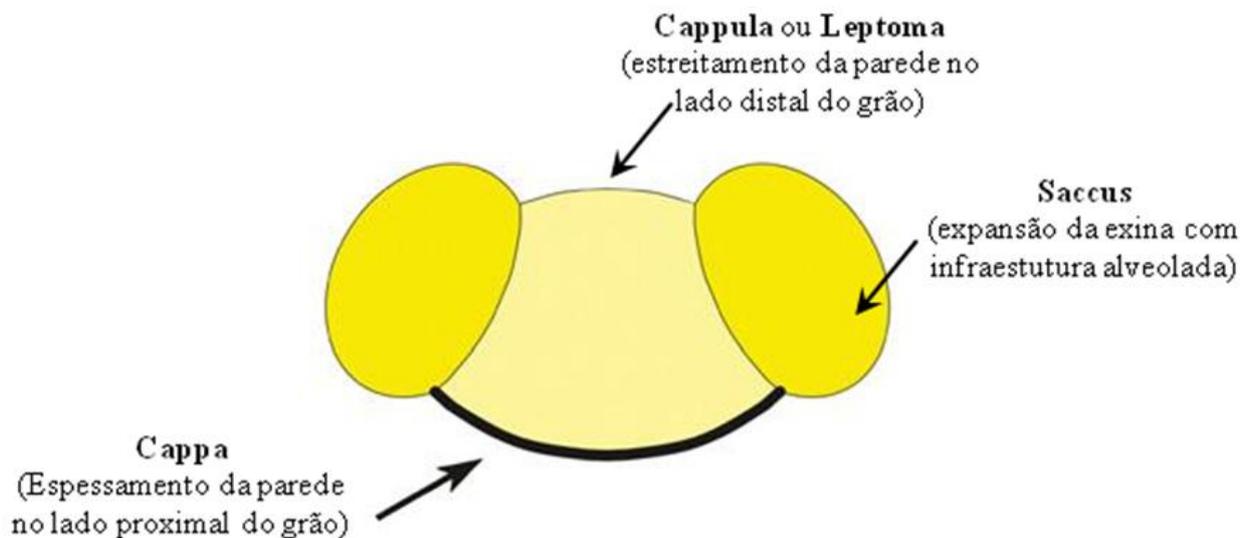


Figura 1.18: Grão de pólen sacado (Adaptado e modificado de PUNT *et al.*, 2007).

Ultraestrutura polínica

O protoplasto de muitos dos pólenes não é descrito, mas as características internas de certos pólenes podem ser úteis na sua identificação. A presença de uma intina espessa ajuda a identificar o pólen de *Populus*. A intina pode ser particularmente densa, como se observa no pólen de *Cupressus*, com um protoplasto irregular em forma de estrela. O pólen das espécies *Juniperus*, particularmente, têm uma exina fina, que frequentemente rebenta e abre na lâmina de microscópio, expulsando a intina redonda, transparente e a porção de protoplasto do grão. O pólen de *Rumex*, têm grânulos

internos de amido proeminentes. As gramíneas também têm grânulos de amido, mas estes comparativamente são menos visíveis.

São as características e ornamentação da parede que permitem a identificação dos grãos de pólen, por vezes, até à espécie, mas mais frequentemente somente ao nível do género (ex.: o pólen de *Plantago*) ou da família (ex.: o pólen de Poaceae). A combinação da estrutura e ornamentação da superfície, juntamente com a forma, a simetria, o tamanho, o número e distribuição das aberturas (poros e/ ou colpos) permitem reconhecer a proveniência floral desses grãos de pólen com maior ou menor precisão (FELBER & CLOT, 2003; BELMONTE *et al.*, 2001).

1.3. A REACÇÃO ALÉRGICA E POLINOSE

O termo “alergia” surgiu no final do séc. XIX para descrever uma reacção anormal que ocorre após a injecção de diferentes proteínas (ex.: vacinas). A reacção alérgica é uma reacção do sistema imunitário anormal e exagerada. É uma reacção de hipersensibilidade que alguns indivíduos, particularmente os predispostos geneticamente, manifestam quando expostos a estímulos, isto é, a substâncias habitualmente bem toleradas e aparentemente inofensivas para a população geral, e que são denominados por alergénios. Os indivíduos, uma vez em contacto com os alergénios, isto é, uma vez sensibilizados, manifestam uma série de sintomas característicos das doenças alérgicas. As manifestações clínicas das doenças alérgicas podem ser muito variadas, com sintomas respiratórios (asma e rinite), oculares (conjuntivite), cutâneos (eczema, dermatite de contacto, urticária) ou digestivos (náuseas, vómitos, diarreias). No caso da alergia respiratória, os alergénios habitualmente penetram nas vias respiratórias (pneumoalergénios) desencadeando sintomas que podem localizar-se exclusivamente nas vias aéreas superiores (rinite, sinusite, conjuntivite, otite) ou também na árvore faringotraqueobronquial (asma).

Os alergénios mais frequentes são os grãos de pólen, os esporos de fungos, as partículas provenientes de ácaros do pó da casa, das faneras de animais (ex.: gato, cão) ou contidas no látex, alguns alimentos e medicamentos. Os alergénios são antigénios capazes de induzir uma resposta do tipo IgE. A maioria dos alergénios são proteínas, glicoproteínas ou lipoproteínas e quanto à função uns são enzimas do tipo proteases, outras proteínas de armazenamento e outros são, por exemplo, proteínas associadas ao stress ambiental (INÁCIO, 2003).

A reacção alérgica é condicionada por factores genéticos, individuais e ambientais. O factor genético (hereditário) há muito que é reconhecido. Os genes implicados são ainda pouco conhecidos, mas causam um enorme interesse por parte dos investigadores, particularmente para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (COOKSON, 1999). Os factores individuais são, por exemplo, certas doenças (ex: infecções víricas) que modulam o aparecimento de alergias. É possível que modificações transitórias das mucosas respiratória, ocular, digestiva ou da pele por agentes infecciosos, por exemplo metabolitos ou outros, permitam a iniciação do processo. Os factores ambientais compreendem factores como a repetida exposição a alergénios, a inalação de substâncias que causam irritação e/ou inflamação nas mucosas, a poluição, a higiene, a dieta (a baixa ingestão de alimentos ricos em vitamina E e D, bem como de antioxidantes, ácido fólico e de ácidos gordos polinsaturados favorece o aparecimento de alergia). Tem-se constado que nenhum dos factores ambientais foi determinante no desenvolvimento de alergia. Possivelmente, outros factores

como, a idade, sexo ou factores climáticos também podem influenciar. Para além do componente genético, o factor principal desencadeante de alergia é a dose e o tempo de exposição ao alergénio, pelo que a medida preventiva primordial deve ser evitar o contacto com o alergénio (FREILE, 2001). As alterações climáticas que se verificaram nas últimas décadas são apontadas como responsáveis pelo contínuo aumento das doenças alérgicas, particularmente nos países Ocidentais (COOKSON, 1999), onde também factores como a globalização, a elevada urbanização e o estilo/modo de vida nas cidades parecem afectar o desenvolvimento correcto do sistema imunitário (LINARES, 2010).

De acordo com LINARES (2010) aproximadamente uma em cada quatro pessoas tem um problema alérgico constituindo esta doença um problema significativo de saúde pública, sobretudo em crianças e adultos que vivem em áreas onde as taxas de prevalência de asma, morbidade e mortalidade são elevadas. Doentes e familiares referem que a doença alérgica tem um impacto negativo na qualidade de vida e, por vezes, é uma potencial ameaça para as suas vidas.

1.3.1. A Reacção Alérgica

A reacção alérgica ocorre num contexto genético e ambiental particular, podendo aparecer em qualquer idade, e resulta da interacção entre um anticorpo (IgE) e um antigénio (alergénio) (INÁCIO, 2003) que desencadeia toda uma sequência de acontecimentos muito complexa mas onde se podem distinguir duas etapas separadas temporalmente: uma fase de indução, de reconhecimento ou de sensibilização, em que o alergénio (antigénio) penetra no organismo e provoca uma reacção do tipo Th2 induzindo a síntese de IgE e o desenvolvimento de uma memória imunitária dependente das IgE (etapa onde o doente ainda não apresenta sintomas), e uma segunda etapa ou fase efectora ou de provocação que se produz após a reexposição repetida, por vezes durante anos, ou logo após a uma segunda reexposição ao alergénio (Figura 1). A reacção alérgica, propriamente dita, ocorre mais tarde com a reexposição ao alergénio e toma diferentes formas segundo o órgão afectado. A libertação de numerosos mediadores pelas células inflamatórias (mastócitos, eosinófilos, basófilos e outras) causam as manifestações clínicas que caracterizam as doenças alérgicas (polinose, rinite, conjuntivite, asma, urticária, eczema e choque anafilático) (TRINDADE, 2003).

1.3.1.1. Fase de sensibilização ao alergénio

No caso do alergénio pólen, um indivíduo ao respirar o grão de pólen em suspensão no ar, este penetra nas vias aéreas e por impacto entra em contacto com as mucosas do nariz ou dos pulmões, dependendo do tamanho, do tipo de respiração e da anatomia das vias respiratórias. Uma vez depositado sobre a superfície da mucosa (epitélio), ele é captado pelos pseudopodes das células dendríticas (CD) ou células apresentadoras de antigénio (APCs) que se encontram no interior do epitélio (LAMBRECHT, 2001). Uma vez no interior das CD, o grão de pólen é fragmentado em pequenos pedaços de proteínas e péptidos. Os péptidos ligam-se em seguida a moléculas denominadas HLA (“*human leukocyte antigen*”) da classe II e são transportados para a superfície da célula. As CD são capazes de se deslocar na mucosa, migram para o gânglio linfático mais próximo (LAMBRECHT, 2001). Os gânglios são centros de reconhecimento do antigénio onde diferentes células implicadas na resposta imunitária podem comunicar. Neste caso, as CD que transportam agora à superfície os diferentes péptidos do grão de pólen, apresentam-nos a um tipo de glóbulos brancos, chamados linfócitos T presentes no gânglio (ROMGNANI, 2001).

Cada linfócito T exprime à sua superfície um tipo de receptor, que lhe é próprio, e que lhe permite reconhecer os péptidos ligados a uma HLA de classe II. Os linfócitos T “*helper*” 0, Th0 ou linfócitos Th indiferenciados são capazes de se ligarem aos péptidos do pólen em questão. Haverá, então, uma ligação transitória entre as CD portadoras de um péptido e o linfócito T portador de um receptor de reconhecimento (ROBEY & ALLISON, 1995). Durante esta ligação, denominada de sinapse imunológica, os linfócitos T são activados e da forma como são activados assim se desenvolve uma reacção alérgica ou de um estado de tolerância face ao pólen. A activação do linfócito Th0 em linfócito Th1 (não alérgico) ou em Th2 (alérgico) é determinada pela acção de diferentes citocinas secretadas no seu ambiente (KAY, 2001) que são mensageiros intercelulares que permitem uma célula transmitir as informações a uma outra célula próxima ou afastada.

Existem numerosas famílias de citocinas, incluindo as interleucinas [IL] e os interferões [IFN] (α , β , γ) [ROMAGNANI, 2002). Os linfócitos Th0 tornam-se linfócitos Th1 sob o efeito da IL-12 secretada pela CD, ou tornam-se Th2 quando expostos à IL-4. Por sua vez, os linfócitos Th1 activados secretam citocinas, sobretudo IFN γ e IL-10 e os Th2 activados IL-4, IL-5 e IL-13. As citocinas vão desempenhar um papel importante no ambiente da mucosa respiratória e à distância, incluindo ao nível da medula óssea. Os linfócitos Th2, na presença da IL-4, activam no gânglio linfático os linfócitos B. Os linfócitos B são células que sintetizam os anticorpos ou imunoglobulinas. Neste caso, os anticorpos produzidos pertencem à classe das Imunoglobulinas E

(IgE) e são capazes de reconhecer e de se ligarem especificamente aos péptidos do pólen (alergénio) (OETTGEN & GEHA, 2001). Uma vez os linfócitos B activados, estes vão sintetizar IgE específicas para o alergénio que serão responsáveis pela reacção alérgica. Uma parte dos linfócitos B e Th2 vão persistir durante anos e constituem assim uma memória imunológica específica muito eficaz. As IgE ligam-se aos receptores dos mastócitos, células que se encontram nas mucosas.

1.3.1.2. Fase efectora ou de provocação

Uma vez reconhecido o alergénio pelos linfócitos Th2, num novo contacto com o alergénio o individuo pode apresentar manifestações clínicas alérgicas. Existem duas fases sucessivas para essa reacção, a **fase imediata** e a **fase tardia**, que podem-se suceder, mas também podem ocorrer isoladamente.

A **fase imediata** é desencadeada quando as IgE se ligam ao alergénio que entrou em contacto com a mucosa respiratória e activam os mastócitos sobre os quais se fixaram, resultando na activação da membrana do mastócito e permitindo a entrada de iões Ca^{2+} que desencadeiam dois processos: em primeiro lugar, a exocitose dos grânulos contidos nos mastócitos, com libertação de grandes quantidades de potentes mediadores que existem no estado de pré-formados (histaminas, enzimas proteolíticas, heparina e factores quimiotácticos) e, em segundo lugar, a indução da síntese de mediadores formados a partir do ácido araquidónico (prostanglandinas, leucotrienos, tromboxanos, factor de agregação das plaquetas - PAF). A acção conjunta de todos estes mediadores sobre os diversos tecidos origina uma série de efeitos fisiopatológicos que dão lugar aos sintomas típicos na alergia: edema, rinite (espirros, rinorreia, prurido nasal e oro faringe, tosse), asma (tosse, pieira, dispneia, sensação de opressão torácica), conjuntivites (prurido ocular, lacrimejo, fotofobia), urticária, eczema, dermatite, entre outros sintomas (CHRISTIE & HENDERSON, 2002).

A **fase tardia** ocorre algumas horas mais tarde e depende de um outro mecanismo. Os linfócitos Th2 estimulados pela exposição ao alergénio libertam no seu ambiente diferentes citocinas. A IL-4 e IL-13 mantêm a reacção alérgica e activam os linfócitos B e assim a síntese de IgE. A IL-5 induz a activação e multiplicação dos eosinófilos, actores importantes na alergia (WELLER, 1997). Os eosinófilos são activados pelas citocinas Th2 como a IL-3 e GM-CSF (factor de crescimento das colónias granulócito-macrofágicas) e libertam, por sua vez, mediadores inflamatórios (ROMAGNANI, 2001). Eles são responsáveis pela segunda vaga da manifestação alérgica que pode assumir a forma de uma obstrução nasal ou de uma segunda crise de asma, por exemplo.

Recentemente, tem sido descrito um terceiro tipo de linfócitos T “*helper*” reguladores, que tem um papel modulador nesta cascata de eventos. É possível que a melhoria dos sintomas alérgicos durante a dessensibilização específica seja em parte devido à estimulação da população de linfócitos reguladores em que, em particular duas citocinas, a IL-10 e TGF β (factor de crescimento transformador β) contribuem para a diminuição da estimulação Th2. Nestas circunstâncias, a reacção alérgica não tem lugar apenas na mucosa mas, também, na corrente sanguínea, podendo generalizar-se. Neste caso, fala-se de anafilaxia. A anafilaxia é secundária à activação das células próximas dos mastócitos, os basófilos, que também possuem IgE específicas à superfície. A libertação na corrente sanguínea de grandes quantidades de mediadores inflamatórios como, a histamina, desencadeiam uma vasodilatação responsável por um choque, chamado choque anafilático (KAY, 2001). É a situação mais grave de alergia e pode levar à morte.

A Figura 1.19 mostra a sequência de acontecimentos da resposta alérgica.

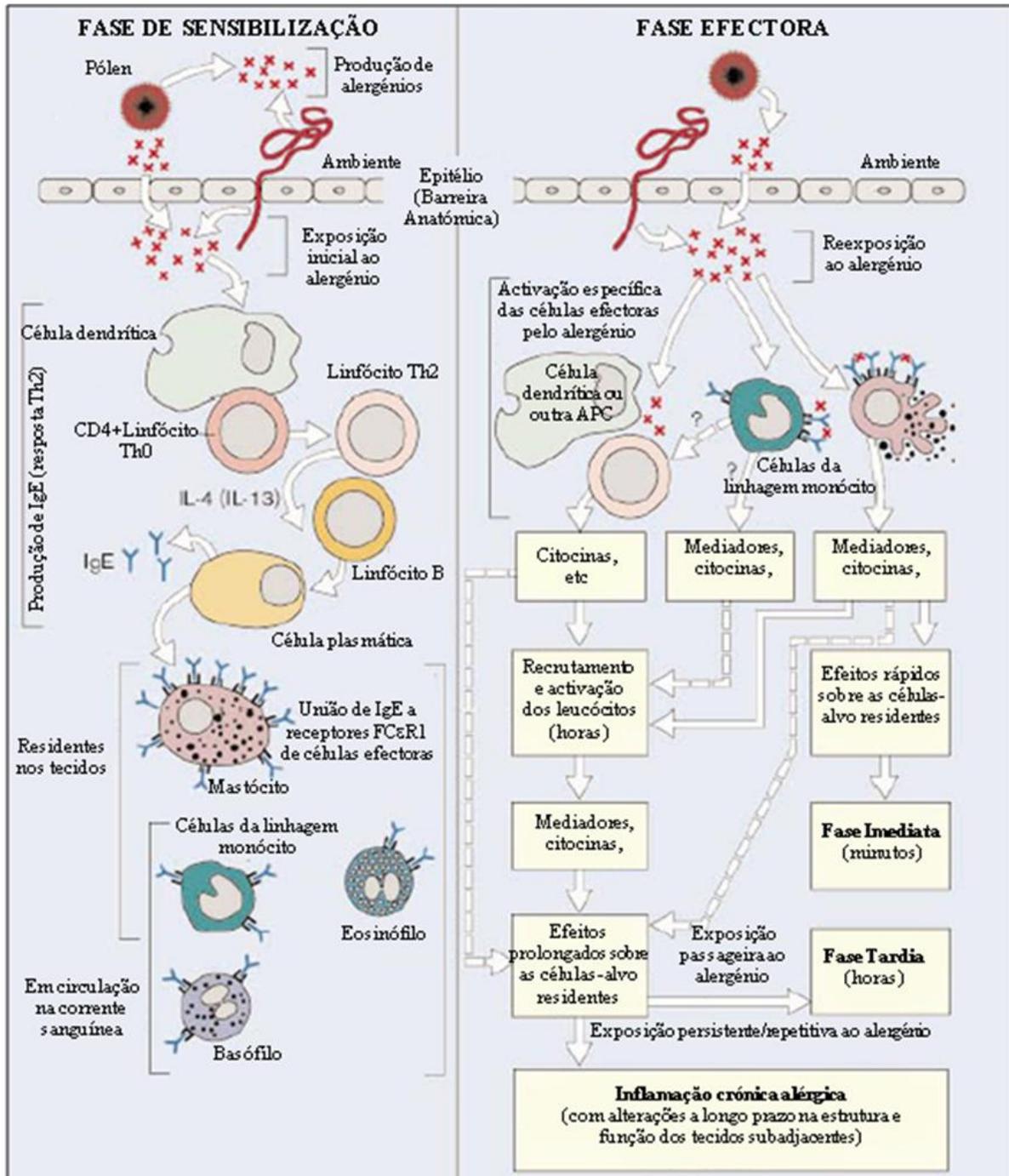


Figura 1.19: Sequência de acontecimentos da resposta alérgica. Fase de sensibilização e fase efectora. Adaptado e modificado de GALLI (2000).

1.3.2. Doença Respiratória Alérgica

A OMS/ WHO (Organização Mundial de Saúde/ *World Health Organization*) reconhece que as doenças respiratórias são a principal causa de morte no Mundo. Na Europa são segunda causa de morte e os custos dessas doenças atingem os 102 biliões de euros anuais e, por serem predominantemente doenças crónicas, 48% desses custos são por dias de trabalho perdidos. E são terceira causa de morte e de internamento por doença em Portugal. Em Portugal, é na região de Lisboa e Vale do Tejo que se registou o maior número de internamentos por doença respiratória por habitante; é no Algarve que a mortalidade dos doentes internados é mais alta; no norte e Alentejo a incidência de doenças respiratórias é significativamente mais baixa (TELES DE ARAÚJO, 2008).

Entre as doenças respiratórias encontram-se as doenças respiratórias alérgicas (rinite, rinoconjuntivite, asma). A rinite alérgica é uma patologia inflamatória crónica da mucosa nasal, mediada imunologicamente, caracterizada em termos clínicos por prurido, esternutação, rinorreia e/ou obstrução nasal. O compromisso inflamatório associado à mucosa conjuntival, define os quadros de rinoconjuntivite, caracterizado por prurido, hiperémia, lacrimejo e edema conjuntival (BOUSQUET *et al.*, 2001). A rinite pode sistematizar-se em formas sazonais e perenes, mas actualmente, a melhor sistematização para caracterizar a doença e o seu impacto é a definição de formas intermitentes (menos de 4 dias por semana ou menos de 4 semanas por ano) e persistentes (mais de 4 dias por semana e mais de 4 semanas por ano), com espectro de gravidade de ligeira a grave (BOUSQUET *et al.*, 2001; DEMOLY *et al.*, 2003). A asma, de acordo com o Programa Nacional de Controlo da Asma (2001), define-se como sendo “uma doença inflamatória crónica das vias aéreas que, em indivíduos susceptíveis, origina episódios recorrentes de pieira, dispneia, aperto torácico e tosse particularmente nocturna ou no início da manhã, sintomas estes que estão geralmente associados a uma obstrução generalizada, mas variável, das vias aéreas, a qual é reversível espontaneamente ou através de tratamento”. Quanto à gravidade a asma pode ser intermitente ou pode ser persistente. No caso de ser persistente pode ser ligeira, moderada ou grave. A gravidade varia de indivíduo para indivíduo e não está necessariamente relacionada com a frequência ou persistência dos sintomas e pode alternar num indivíduo ao longo do tempo (*Global Initiative for Asthma*, 1995).

A prevalência das doenças respiratórias alérgicas duplicou nos últimos 10 anos em muitos países da Europa (TELES DE ARAÚJO, 2008). Estima-se uma prevalência global de rinite de até 30% na população europeia, sendo uma das doenças crónicas mais prevalentes (BOUSQUET *et al.*, 2001; ISAAC, 1998); em Portugal a prevalência e a gravidade das doenças respiratórias alérgicas

também tem aumentado e de uma forma estatisticamente significativa (ISAAC, 1998; NUNES & LADEIRA, 2005; ROSADO PINTO, 2011), e estima-se que existam mais de 1 milhão de asmáticos (TELES DE ARAÚJO, 2008). Em Portugal mais de 25% da população refere queixas de rinite alérgica. Segundo o estudo epidemiológico transversal ARPA, desenvolvido em 2004 nas unidades de saúde da rede de cuidados e saúde primários (Centros de Saúde), com o objectivo principal determinar a prevalência de rinite em Portugal Continental, em indivíduos com idade igual ou superior a 16 anos, a prevalência de rinite foi de 26,1% e a de rinoconjuntivite de 18,4%; em termos regionais a prevalência de rinite mais elevada registou-se no Alentejo, 30%; a menor no Algarve, 16%; e no Norte, Centro e Lisboa e Vale do Tejo entre os 25% e 29% (MORAIS-ALMEIDA *et al.*, 2005). A patologia alérgica das vias aéreas é muito frequente e mais de 1/5 das crianças entre os 3 e os 5 anos tem clínica compatível com rinite e uma percentagem ainda maior refere sibilância no último ano, o que aponta para queixas sugestivas de asma (TELES DE ARAÚJO, 2008).

Ainda antes do estudo ARPA, no final dos anos 90 desenvolveu-se, a nível Mundial, um estudo epidemiológico sobre a prevalência de doenças alérgicas, como rinite alérgica, rinoconjuntivite, asma e dermatite ou eczema atópico e envolveu cerca de 1 milhão de inquiridos a crianças em idade escolar e foi designado por ISAAC – *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (STRACHAN *et a.*, 1997; ISAAC, 1998; STRACHAN, 2000). Em Portugal, no estudo ISAAC, foram envolvidos mais de 35.000 crianças de 6-7 e 13-14 anos, oriundos de várias regiões do continente e ilhas e mais de 300 escolas, e entre os resultados da fase II deste estudo, portanto, em 2003, encontrou-se uma prevalência de asma activa infantil de 11-12%, e relativamente à gravidade da asma, a maioria, cerca de 70% apresentava asma ligeira, 20% asma moderada e < 10% asma grave (ROSADO PINTO, 2011), o que representa um aumento de 24,5% em relação a uma década antes (TELES DE ARAÚJO, 2008). Os maiores incrementos da prevalência de asma verificaram-se nas cidades portuguesas com maior população: Lisboa e Porto (ROSADO PINTO, 2011). Verificou-se com o estudo ISAAC que a asma é uma das doenças crónicas infantis mais frequentes que afecta os jovens portugueses. (ROSADO PINTO, 2011).

A rinite, a asma e eczema atópico encontram-se frequentemente associados, mas a natureza desta ligação continua por esclarecer. Segundo ROSADO PINTO (2011) estudos recentes efectuados em adultos e crianças, identificaram a rinite como um dos principais factores de risco independentes para a expressão de asma, bem como para a persistência dos sintomas, ficando por esclarecer se a asma representa uma progressão natural da rinite que será uma doença única da via aérea; e a influência da rinite seria ainda superior à do eczema atópico, classicamente considerado intimamente implicado na expressão de asma. Os factores de risco da asma podem estar ligados ao individuo

hospedeiro (genética, raça, género, etc.) ou ao ambiente (infecções, dieta, alérgenos, poluentes, etc.). Factores de risco encontrados no estudo ISAAC foram: a história pessoal de rinite alérgica; o contacto com o gato fora de casa no primeiro ano de vida; história materna de doença alérgica, asma brônquica e/ou rinite alérgica; história pessoal de eczema atópico; sexo masculino; frequência de infantário antes dos 12 meses de vida e mãe fumadora no primeiro ano de vida. Na asma grave o único factor de risco estatisticamente significativo foi o tabagismo passivo relacionado com hábitos maternos (ROSADO PINTO, 2011).

No estudo RDR 2000 – *Redefinindo a Rinite* (CASTEL-BRANCO *et al.*, 2000), estudo promovido pela SPAIC, com questionários adaptados do questionário do estudo ISAAC, aplicados a utentes dos Centros de Saúde de todos os distritos de Portugal Continental selecionados por amostragem aleatorizada, sistemática e sem limitação etária, cujo o inquérito aplicou-se durante a entrevista efectuada pelo médico assistente, os factores desencadeantes de sintomas de rinite, mais frequentemente identificados foram: o pó doméstico e os pólenes, sendo as queixas mais frequentes nos meses de Março a Maio e de Setembro a Novembro. A história familiar de doenças alérgica e pessoal de atopia (asma, dermatite atópica), associaram-se positivamente ao diagnóstico de rinite.

Nos estudos ARPA e RDR 2000 observou-se a existência de uma clara situação de sub-diagnóstico e de sub-tratamento; o tratamento quando foi instituído, baseou-se quase exclusivamente em anti-histaminicos, identificando-se muita fraca utilização de corticoides tópicos, frequentemente indicados quando a obstrução nasal predomina. A acessibilidade dos doentes a consultas de especialidade evidenciou-se também insuficiente, realçando a necessidade de fomentar intercâmbios entre toda a equipa envolvida na prestação de cuidados de saúde à população com patologia alérgica, permitindo assim a obtenção de ganhos de saúde, e aumento de qualidade de vida (MORAIS-ALMEIDA *et al.*, 2005). O sub-diagnóstico e o sub-tratamento são frequentes e têm importantes repercussões em termos de qualidade de vida dos indivíduos afectados (BOUSQUET *et al.*, 2001; STORMS, 2002).

Segundo TELES DE ARAÚJO (2008) continua a haver um consumo excessivo de broncodilatadores de curta acção, ainda que pareça haver uma tendência crescente para cumprimento das normas aprovadas para o tratamento da doença, e isso poderá justificar a redução marcada da mortalidade que se tem registado.

1.3.2.1. Polinose (alergia ao pólen)

A primeira definição científica de polinose foi efectuada por Bostock em 1819 num trabalho apresentado na Sociedade Médico-Cirúrgica de Londres onde o autor descreveu a sua própria doença que somente se manifestava durante a estação do feno em Inglaterra (Junho-Julho) denominando-a por isso de “febre-do-feno” (VALERO & PICADO, 2002) e descrevendo-a como uma doença que afecta o trato respiratório superior (<http://www.allergyclinic.co.nz/guides/39.html>, The History of Allergy).

Mais tarde, em 1869, Blackley descreveu que a polinose ou “febre-do-feno” era desencadeada pela exposição ambiental aos grãos de pólen de gramíneas.

Actualmente, a expressão “febre-do-feno” não se utiliza, e a polinose ou alergia ao pólen define-se pela inflamação da mucosa nasal e/ou conjuntival e/ou bronquial causada por alergénios contidos nos grãos de pólen através de um mecanismo imunológico mediado pela IgE (VALERO & PICADO, 2002).

Para o diagnóstico as técnicas mais utilizadas para a determinação com maior precisão das moléculas que são responsáveis pela alergia do doente são as provas cutâneas para alergia (testes cutâneos em “*prick*” ou laboratorialmente pelo doseamento quantitativo das IgE específicas séricas para os alergénios).

Uma vez diagnosticada a alergia, o tratamento passa por minimizar a exposição ao alergénio combinado com medicamentos que reduzem a sintomatologia e a inflamação, entre os medicamentos utilizam-se principalmente antihistamínicos. Para além disso, com o objectivo de modificar a resposta imunológica e assim diminuir a intensidade da reacção alérgica pode-se também fazer imunoterapia (vacinas).

1.3.2.2. Grão de pólen como principal aeroalergénio

Os grãos de pólen contêm proteínas específicas, entre as quais enzimas, associadas à parede ou mesmo presentes no protoplasto, que intervêm no processo de reconhecimento e aceitação destes por parte de receptores específicos existente nos pistilos das plantas (PACINI, 1990) e que, por vezes, comportam-se como alergénios desencadeando reacções alérgicas (CHIEIRA *et al.*, 1981) em indivíduos geneticamente susceptíveis. Nem todos os grãos de pólen causam polinose, isto é, não são

todos igualmente alergénicos, pois só determinadas espécies de plantas produzem grãos de pólen com propriedades alergénicas (SPIEKSMÁ, 1990). Geralmente, são plantas anemófilas, embora as entomófilas, mais raramente, também possam causar problemas alérgicos, visto que contêm, igualmente, proteínas antigénicas (SPIEKSMÁ, 1990; MONDAC *et al.*, 1998).

Dada a dimensão média dos grãos de pólen (12 a 70 μm) a clínica predominante associada a este grupo alergénico é a rinosinusite e a conjuntivite, pois o grão de pólen intacto dificilmente penetra nas ramificações brônquicas a não ser que tenham sido previamente colapsados por exsicação decorrente da exposição a condições atmosféricas adversas nomeadamente a temperaturas muito elevadas e baixo grau de humidade. Contudo, a ocorrência de asma nos indivíduos sensibilizados ao pólen é muito frequente e pode estar relacionada com a exposição desses indivíduos a partículas polínicas (fragmentos de pólen, proteínas polínicas) atmosféricas de dimensões inferiores a 2,4 μm (TODO-BOM, 2003).

Outras partículas de origem vegetal com propriedades alergénicas são os fragmentos de caules e de folhas de plantas alergizantes. Porém, estas partículas apresentam uma potência alergénica reduzida quando comparada com a das proteínas polínicas (D'AMATO *et al.*, 1991).

1.3.2.3. A importância e a prevalência de polinose no Mundo e em Portugal

O pólen atmosférico no ambiente exterior (*outdoor*) é a principal causa de rinite, asma brônquica, rinoconjuntivite e eczema nos indivíduos alérgicos ao pólen (D'AMATO *et al.*, 1991; TODO-BOM & TAVARES, 2004). A alergia ao pólen tem um importante impacto clínico na Europa (D'AMATO *et al.*, 1991) e há evidência de que, nas últimas décadas, tem aumentado nos países industrializados a prevalência de doenças alérgicas induzidas por pólen, particularmente na Europa Ocidental, (WUTHRICH, 1989; BURNEY, 1993; MONTGOMERY, 1988; D'AMATO *et al.*, 1998; MORAIS-ALMEIDA *et al.*, 2005; GASPAR *et al.*, 2006; RODRÍGUEZ-RAJO *et al.*, 2010), a par do aumento da prevalência de outras patologias alérgicas (BOUSQUET *et al.*, 2001). Cerca de 10% da população do Norte, Centro e Leste da Europa e mais de 10% no Sul da Europa sofre de doença alérgica induzida por alergénios polínicos (SYRIGOU *et al.*, 2003). Estudos recentes efectuados por TAYLOR e outros investigadores (2007) *in* RODRÍGUEZ-RAJO *et al.* (2010) referem que 80-90% das crianças asmáticas e 40-50% dos adultos asmáticos têm alergia ao pólen. O pólen proveniente de

gramíneas constitui uma das principais causas de alergia em muitos locais do Mundo (LLAMAS & ACEDO, 2002; CERVIGÓN *et al.*, 2002; D'AMATO *et al.*, 1998), e é um dos mais importantes aeroalergénios na Europa (SÁNCHEZ-MESA *et al.*, 2003; GARCÍA-MOZO *et al.*, 2010), provocando sintomas alérgicos em mais de 80% dos indivíduos com sensibilização ao pólen na Europa (D'AMATO *et al.*, 2007), sendo a causa mais importante de polinose na área Mediterrânica (DIAZ DE LA GUARDIA *et al.*, 1995, D'AMATO, 1998), e em Portugal (TODO-BOM *et al.*, 2006; TODO-BOM & TAVARES, 2004) onde a sensibilização aos pólenes representa cerca de 40% do total de sensibilizações. Em Portugal, inclusivamente nas regiões referidas neste estudo, tal como acontece e é referido noutras áreas mediterrânicas, a seguir à sensibilização ao pólen das gramíneas (78% a 96%) e, na maioria dos casos juntamente com esta, vem a sensibilização aos pólenes de *Olea europaea* (13,6% a 49%) e de *Parietaria* (9,1% a 42%) [LOUREIRO *et al.*, 2003; BRANDÃO, 1996; CAEIRO *et al.*, 2002, 2003, 2010; LOPES *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2006].

Nos dias de hoje, o conteúdo polínico da atmosfera por si só e/ou juntamente com outros factores, tais como a poluição, tem cada vez mais repercussões sobre a saúde humana, afectando, de forma muito importante, a qualidade de vida das populações. De acordo com um relatório da Organização Mundial de Saúde (WHO, Roma, 2003), na região Mediterrânica aumentou a sensibilização ao pólen de *Olea europaea* L. e, de uma maneira geral, nas áreas urbanas aumentou a sensibilização ao pólen de *Platanus hispanica* Mill. ex Münchh e ao de Cupressaceae/ Taxaceae. De acordo com este mesmo relatório, prevê-se que a incidência de pólen alergénico venha a aumentar na Europa nos próximos 10 anos devido a múltiplos factores (poluição atmosférica, aumento da exposição doméstica e profissional aos alergénios, uso indiscriminado de produtos sintéticos, etc.) [WÜTHRICH, 1989; CHIEIRA, 1995] sem que, no entanto, se preveja uma mudança das medidas de prevenção primárias em tão curto espaço de tempo. Por conseguinte, cada vez mais, existe uma maior preocupação, por parte dos investigadores, para encontrar explicações para o aumento da incidência de pólen alergénico, enquanto factor de risco da doença alérgica respiratória. A título de exemplo, uma das hipóteses formuladas por investigadores, tais como, JÄGER (2002), PENEL *et al.* (2002), GEHRIG *et al.* (2002) e FEDESCHINI & FRENGUELLI (2002) está relacionada com o aquecimento global do planeta que é responsável pelas alterações climáticas e que tem como um dos principais indicadores o contínuo aumento da temperatura média. Sabe-se que a temperatura do ar é o principal parâmetro associado às alterações inter-anuais na polinização de muitas plantas. Uma estação polínica prolongada é referida nos Climas Oceânico, Suboceânico, Mediterrânico e Alpino, enquanto os Climas Subcontinental e Boreal tendem a apresentar um período de polinização curto (JÄGER, 2002). Com o aquecimento global tem-se verificado uma tendência para inícios e picos de

floração mais precoces e para períodos de polinização mais longos e, conseqüentemente, observam-se longas estações de floração e aumento dos totais anuais na maioria dos casos (JÄGER, 2002; PENEL *et al.*, 2002; GEHRIG *et al.*, 2002). Num estudo realizado por TEDESCHINI e FRENGUELLI (2002) em Perugia (Itália), em que os investigadores procederam à análise dos impactos das alterações da temperatura na polinização, utilizando dados de 20-25 anos de monitorização polínica e a temperatura média do ar, verificou-se que a variabilidade das datas de início e a duração da polinização é, em média, superior nos *taxa* que florescem no Inverno ou início da Primavera. Nesse estudo, a título de exemplo, as Urticáceas registaram um aumento médio da estação polínica de 20 dias devido a um início de polinização mais precoce e a um prolongamento desse processo até mais tarde.

1.3.2.4. Pólen de Poaceae

As poáceas (gramíneas), para além do seu carácter alergénico, possuem uma capacidade de colonizar diferentes ecossistemas e de ocupar extensas áreas de solo, graças à sua grande capacidade de reprodução (DIAZ DE LA GUARDIA *et al.*, 1995; SANCHEZ-MESA *et al.*, 2003). As plantas da família Poaceae (Gramineae) apresentam uma distribuição cosmopolita (muitos dos membros que constituem esta família estão amplamente distribuídos, adaptados a todos os tipos de clima, presentes em quase todos os ecossistemas e em qualquer tipo de habitat). As Poáceas representam quase 20% da flora em todo o Mundo (MABBERLEY, 1987), existindo, inclusive, uma grande diversidade e abundância destas plantas nas áreas urbanas (RODRÍGUEZ-RAJO *et al.*, 2010). É uma família constituída por 650 - 700 géneros e cerca de 12.000 espécies, com uma polinização quase exclusivamente anemófila, e muito importantes a nível alimentar (constituem a principal fonte de alimento, ex.: arroz, milho e trigo), económico, florístico e, até mesmo, a nível de saúde pública.

A família Poaceae encontra-se bem representada na Península Ibérica, fazendo parte integrante da paisagem mediterrânica, onde constitui o elemento dominante da vegetação herbácea do bosque e das pastagens semi-naturais do montado. São muito abundantes em qualquer habitat em redor das cidades, formando parte dos pastos, comunidades de plantas infestantes de campos de cultivos, etc. Nas zonas urbanas, as Poaceae são abundantes nos locais não urbanizados e nos cursos de água (CAEIRO, 2004). Apesar de ser composta por uma dezena de milhares de espécies, somente um pequeno número é responsável pela maioria do pólen atmosférico alergizante (EMBERLIN *et*

al., 1999; SUBIZA, 2002, 2003; PRIETO-BAENA *et al.*, 2003). Nas espécies estudadas pelos autores PRIETO-BAENA *et al.* (2003) a produção de pólen vai de $14,5 \times 10^4$ a 22×10^6 grãos de pólen por inflorescência, e foi superior nas espécies perianuais. De acordo com SUBIZA (2003), os géneros que causam polinose pertencem às subfamílias *Pooideae* (*Phleum*, *Dactylis*, *Lolium*, *Trisetum*, *Festuca*, *Poa*, *Anthoxanthum*, *Holcus*, *Agrotis*, *Alopecurus*), à subfamília *Chloridoideae* (*Cynodon* spp.), e à subfamília *Panicoidae* (*Sorghum* e *Paspalum*). Na Galiza, RODRÍGUEZ-RAJO e outros investigadores (2010) referem também os géneros *Avena*, *Arrhenatherum*, *Vulpia* e *Bromus* como abundantes e causas de polinose nessa região. No Sul de Espanha, segundo alguns estudos (PRIETO-BAENA *et al.*, 2003; PRIETO-BAENA, 2004) existem outras *taxa* com uma importante contribuição no espectro polínico nomeadamente, *Holcus lanatus* L., *Trisetaria* spp., *Elymus repens* L. e *Piptatherum miliaceum* (L.) Coss. Em Portugal, para além da sensibilização ao pólen de alguns dos *taxa* anteriormente referidos, diversos estudos também referem sensibilização dos doentes ao pólen de gramíneas cultivares (cereais), tais como: *Hordeum bulbosum*, *Secale cereale*, *Avena sativa*, *Triticum aestivum* e *Zea mays* (LOPES *et al.*, 2004; CAEIRO *et al.*, 2002, 2003, 2006, 2007).

Dado que o pólen é um factor de risco para as doenças alérgicas respiratórias é de particular interesse encontrar o valor limiar a partir do qual se desencadeiam sintomas de polinose nos indivíduos sensibilizados. Este valor é bastante subjectivo pois depende múltiplos factores. LATORRE e BELMONTE (2004) e SUBIZA *et al.* (2002) citam entre tais factores: a natureza do *taxon*, as características regionais, o grau de gravidade da polinose no doente, a presença de sensibilizações a outros pólenes de plantas que polinizam simultaneamente com as gramíneas (ex.: *Olea*, *Plantago*, *Rumex*), o grau de gravidade dos sintomas que vai diminuindo ao longo da estação, a presença de aeroalergénios que se encontram em micropartículas fora dos grãos de pólen e cujas concentrações podem apresentar grandes divergências das contagens polínicas, o grau de exposição ao pólen, a localização do colector (altura e paisagem em redor). Com base em diversos estudos, estes mesmos autores definiram como valor umbral de reactivação um intervalo oscilando entre os 10 e os 50 grãos de pólen/m³ de ar. A rede Aerobiológica da Catalunha – CAN (BELMONTE *et al.*, 2000) criou uma escala com várias categorias de níveis de risco unicamente para o pólen das gramíneas onde considera um risco muito elevado de exposição quando a concentração semanal excede os 30 grãos de pólen/ m³ (nível 0: risco nulo ou sem risco - 0 grãos de pólen/ m³/ semana; nível 1: baixo risco - 0,1 – 4,9 grãos de pólen/ m³/ semana; nível 2: risco médio - 5-19,9 grãos de pólen/ m³/ semana; nível 3 - risco elevado: 20-29,9 grãos de pólen/ m³/ semana e nível 4: risco muito elevado - > 30 grãos de pólen/ m³/ semana). Já em 1973, os investigadores DAVIES e SMITH e,

posteriormente, em 1997, ONG e outros investigadores indicaram nos seus estudos a concentração de 25 grãos de pólen/ m³ como indutora de sintomas moderados de alergia. Em 2007, a REA – Rede Espanhola de Aerobiologia definiu como valor limiar a partir do qual os doentes alérgicos às gramíneas revelam sérios sintomas de alergia, o valor de 25 grãos de pólen/m³ (GALÁN *et al.*, 2007). A alergenicidade do pólen de Poaceae poderá ser maior devido à reactividade cruzada (VARELA *et al.*, 1997), nomeadamente entre o pólen de diferentes espécies ou entre o pólen de gramíneas e o pólen de outras plantas filogeneticamente diferentes, tais como, *Platanus*, *Olea* e *Parietaria* (GONZÁLEZ *et al.*, 1987; SUBIZA *et al.*, 2002; HERNANDEZ DE ROJAS *et al.*, 1991). Espécies diferentes, por vezes até filogeneticamente diferentes, partilham em comum antigénios com capacidade alergénica que provocam sintomas alérgicos intensos em indivíduos sensibilizados (LARESE *et al.*, 1992; NEGRINI *et al.*, 1992). É extremamente importante quer para os profissionais de saúde, quer para o doente, a existência de uma informação disponível sobre os níveis de pólen de Poaceae presentes na atmosfera de uma dada região.

A floração efectua-se praticamente ao longo de todo o ano. Porém, a maioria das espécies florescem de Março a Julho/ Agosto (CAEIRO, 2004; LATORRE & BELMONTE, 2004; GONZÁLEZ MINERO *et al.*, 1998).

A duração e intensidade da estação de pólen atmosférico varia entre regiões, devido a diferenças na vegetação, uso do solo, latitude, altitude e clima (RAJU *et al.*, 1985; CONNOR, 1986; EMBERLIN *et al.*, 1994; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 1999; SÁNCHEZ-MESA *et al.*, 2003; GARCÍA-MOZO *et al.*, 2009). A nível local a fenologia das gramíneas sofre variações de ano para ano dependendo das condições climatológicas do ano (EMBERLIN *et al.*, 1994; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 1999).

Morfologia do pólen de Poaceae

Os grãos de pólen provenientes dos *taxa* da família Poaceae são morfologicamente idênticos, pelo que é praticamente impossível a sua separação, quer ao nível genérico, quer ao nível específico, daí que, frequentemente, se considere um único tipo polínico generalizável a toda a família. Por conseguinte, como refere BRICCHI *et al.* (1992) a homogeneidade morfológica do pólen de Poaceae faz com que seja muito difícil determinar o período de polinização para cada espécie. Contudo, é do conhecimento que as espécies silvestres libertam grãos de pólen mais pequenos (10-40 µm) que as

cultivares (cereais) (40-80 μm) e que são responsáveis por 5 a 10 vezes mais alergias (THIBAUDON & LAAIDI, 2002). Em termos de morfologia do pólen, o pólen de gramíneas (Figura 1.20) é um pólen monoporado, heteropolar, com simetria radial. Tamanho pequeno - grande 22-80 μm . Aberturas simples, tipo poro, com uma membrana apertural granulada, formando um grande opérculo. Superfície e citoplasma granulados. A exina, membrana exterior da parede do grão de pólen, é bastante fina mas, espessa ligeiramente em redor do póro, formando um anel (CAEIRO, 2004).



Figura 1.20: Grão de pólen de Poaceae ao Microscópio óptico corado com fucsina básica.

1.3.2.5. Pólen de *Olea europaea*

O género *Olea* está representado na região mediterrânica por uma única espécie *Olea europaea* L. e duas variedades, *O. europaea* var. *sylvestris* (zambujeiro), que faz parte da vegetação natural, e *O. europaea* var. *europaea* (oliveira), que é cultivada sobretudo pelo fruto e suas aplicações. A oliveira é uma árvore com longa longevidade, cultivada pelo Homem há mais de 5.000 anos pelo seu fruto, azeite e madeira. O seu cultivo iniciou-se na área mediterrânica oriental, na Ásia menor, e expandiu-se em direcção a oeste, por toda a bacia mediterrânica, atingindo a Península Ibérica (MANOUSIS & MOORE, 1988; DÍAZ DE LA GUARDIA *et al.*, 2003). Actualmente, a oliveira é uma espécie arbórea muito importante do ponto de vista económico, pois é a árvore mais cultivada de forma extensiva, intensiva e superintensiva na área mediterrânea, nomeadamente no Sul da Península Ibérica para a produção de azeite (ALBA *et al.*, 2000; Portugal Agrícola 1980-2006, 2007, INE). Hoje, a Espanha lidera a produção de azeite a nível mundial, e apesar de esta cultura estar largamente distribuída, a oliveira está principalmente concentrada no Sul, onde em algumas províncias de Andaluzia tem mais de 60% da sua área de superfície dedicada ao cultivo da oliveira (1

milhão de hectares), a província de Jaén dedica mais de 90% (500.000 hectares), tornando-se a zona com a produção mais elevada de azeite no Mundo (DÍAZ DE LA GUARDIA *et al.*, 2003; FLORIDO *et al.*, 1999). Em Portugal o seu cultivo ocupa 379.616 ha (Estatísticas Agrícolas 2007, INE) aproximadamente cerca de 11,3% da área agrícola continental. É uma das principais culturas permanentes em Portugal e prevê-se que o seu cultivo aumente no País devido ao renovado interesse por parte dos agricultores por esta cultura (Portugal Agrícola 1980-2006, 2007, INE) e apoios, por parte do Estado (Ministério da Agricultura), para novas plantações e modernização do olival, bem como para transformação e promoção do azeite através do Programa de Desenvolvimento Regional (ProDeR) 2007-2013 (Anuário Estatístico de Portugal 2007, 2008, INE). A oliveira é cultivada de forma extensiva sobretudo no Sul do País, na região do Alentejo, onde o seu cultivo extensivo de forma intensiva e super-intensiva tem aumentado de forma significativa (Boletim Mensal da Agricultura, Pescas e Agro-industria, Janeiro 2009, INE; Portugal Agrícola 1980-2006, 2007, INE), mas também é vulgarmente cultivada em pequenas quintas e pomares e/ou inclusive como árvore ornamental (BRANDÃO, 1996; CAEIRO, 2004). As Figuras 1.21 e 1.22 mostram a representatividade por região da área de olival para azeite em Portugal no ano de 2006.

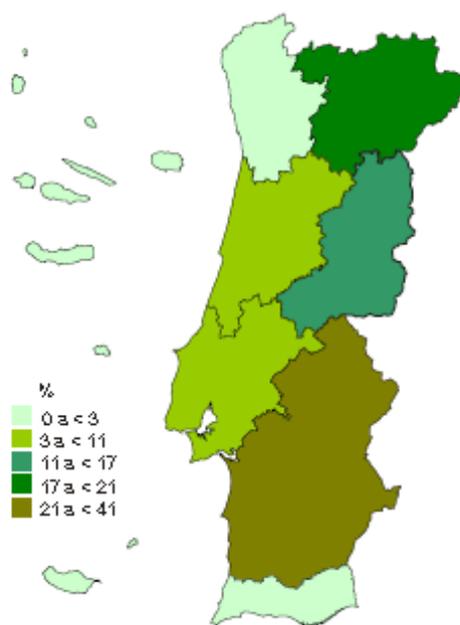


Figura 1.21: Área de olival para azeite, representatividade por região 2006 (Adaptado de Portugal Agrícola 1980-2006, 2007)

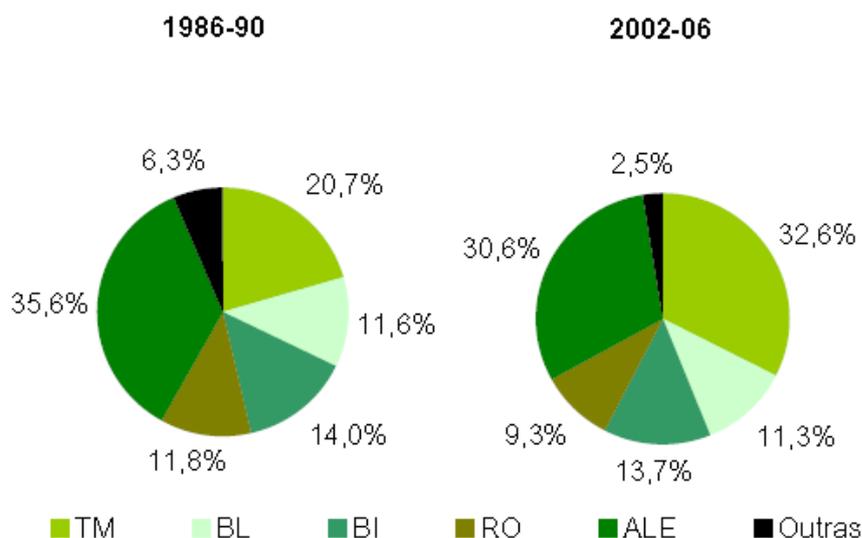


Figura 1.22: Produção de Azeite, representatividade por região (TM- Trás-os-Montes, BL- Beira Litoral, BI- Beira Interior, RO- Ribatejo, ALE- Alentejo) (Adaptado de Portugal Agrícola 1980-2006, 2007).

A oliveira apresenta uma polinização anfífila, originalmente com uma polinização maioritariamente entomófila (polinizada pelos insectos) porém, devido a processos de selecção tendente à criação de variedades com elevada produção de flores, elevada quantidade de pólen produzido por flor (aproximadamente $1,8 \times 10^5$ grãos de pólen por flor; TORMO MOLINA *et al.* 1996), e facilidade de transporte do pólen pelo vento passou a apresentar também um forte componente anemófila (polinizada pelo vento). Por conseguinte, nas localidades onde é cultivada ao longo de extensas áreas registam-se elevadas concentrações de pólen de *Olea* na atmosfera, por exemplo, nas localidades do sul de Espanha como Córdoba, Granada e Jaén chegaram-se a registar índices polínicos anuais superiores a 33.000, 25.000 e 116.000, respectivamente (ALCÁZAR *et al.*, 2004; ALBA *et al.*, 2004; RUIZ *et al.*, 2004), na província de Jaén chega-se a atingir uma média semanal de 500 grãos/ m³ de ar e excepcionalmente em dias de pico mais de 5.000 grãos/ m³ de ar (FLORIDO, 1994).

O período de polinização desta espécie é muito curto e intenso e o seu pólen encontra-se na atmosfera principalmente entre Maio e início de Junho, período durante o qual são libertadas grandes quantidades de pólen.

A *Olea*, tal como os taxa *Quercus* e *Betula*, apresenta um ritmo bianual de floração. Geralmente, após anos de elevada produção polínica sucedem-se anos de reduzida produção polínica (MACCHIA *et al.*, 1987; BELMONTE & ROURE, 1992; DOMINGUEZ-VILCHES *et al.*, 1993; NIEDDU *et al.*, 1997; BRANDÃO, 1996; BRITO *et al.*, 1998).

A oliveira é também muito importante do ponto de vista alergológico, podendo ser considerada um risco para a saúde pública em certas áreas. O seu pólen é um dos aeroalergenos mais importantes na Europa Mediterrânica (Portugal, Espanha, Itália, Israel, Grécia e Turquia) e em algumas zonas da América do Norte (Califórnia, Arizona), onde a sensibilização a este pólen é uma das causas mais frequentes de doenças alérgicas (D'AMATO *et al.*, 1988; WAISEL *et al.*, 1995; BICAKCI *et al.*, 1996; RODRÍGUEZ *et al.*, 1995; LAHOZ *et al.*, 1995; PALACIOS *et al.*, 1999; SUBIZA *et al.*, 1998; VAZQUEZ *et al.*, 2002; PRIETO *et al.*, 1998). Em Espanha é considerado a segunda causa mais importante de rinite e/ou asma brônquica (SUBIZA *et al.*, 1998; HERNÁNDEZ *et al.*, 1995; MINERO & FERNÁNDEZ-MENSAQUE, 1996) assim como na região do Alentejo, região do Sul de Portugal, (CAEIRO *et al.*, 2003; LOPES *et al.*, 2004).

De acordo com um estudo efectuado por FLORIDO *et al.* (1999) existe uma correlação bastante significativa entre as concentrações polínicas de *Olea* e os sintomas de SAR (Rinite Alérgica Sazonal) verificando-se que cerca de 400 grãos/ m³ de ar são suficientes para desencadear leves sintomas de rinite sazonal em indivíduos sensibilizados.

O pólen de *Olea* contém uma complexa mistura de proteínas alergénicas, das 20 bandas detectadas em extractos de pólen apenas metade estão descritas, sendo a *Ole e 1*, o alergénio major ou o principal alergénio, de 20 kDa. Para além desta proteína já se isolaram, identificaram e caracterizaram as proteínas: *Ole e 2*, *Ole e 3*, *Ole e 4*, *Ole e 5*, *Ole e 6*, *Ole e 7*, *Ole e 8*, *Ole e 9*, todas elas com massas moleculares inferiores a 35 kDa. Muitos trabalhos têm descrito polipéptidos de maior peso molecular (42 kDa, 45 kDa, 60-65 kDa e 70 kDa) e alguns desses polipéptidos parecem mostrar um elevado significado clínico mas, não foram ainda caracterizados (CONDE HERNÁNDEZ *et al.*, 2002).

De acordo com muitos autores existe uma reactividade cruzada entre o pólen de *Olea* com o pólen de certas oleáceas, como *Fraxinus*, *Ligustrum*, *Phillyrea*, *Forsythia* e *Syringa* (FILON *et al.*, 1998; PEETERS, 1998; BOUSQUET *et al.*, 1985; OBISPO *et al.*, 1993; MARTÍN-OROZCO *et al.*, 1994; BOUSQUET *et al.*, 1985; KERNERMAN *et al.*, 1992) e também com o pólen de espécies não relacionadas filogeneticamente, como as gramíneas, a *Lolium perenne*, a *Artemisia vulgaris*, a *Betula verrucosa* (GONZÁLEZ *et al.*, 2000; GONZÁLEZ *et al.*, 2000), a *Chenopodium album* (GÓMEZ *et al.*, 2001; NAVARRO *et al.*, 2001), o pinheiro e o cipreste (GONZÁLEZ *et al.*, 2000).

A maioria dos doentes sensibilizados ao pólen de *Olea europaea* apresenta outras sensibilizações associadas (Gramineae, *Parietaria*), i.e. são polisensibilizados, sendo raro encontrar doentes monossensibilizados. A monossensibilização ao pólen do *taxon Olea* é mais comum nas áreas

onde esta é cultivada de uma forma extensiva (FLORIDO *et al.*, 1999; HERNÁNDEZ DE ROJAS *et al.*, 1991; HERNÁNDEZ *et al.*, 1995).

Em estudos sobre o impacto das alterações climáticas e as tendências para o aquecimento global é referido que a oliveira é muito importante, na medida em que, pode ser utilizada como um bio-indicador de alterações climáticas em toda a região Mediterrânica (ORLANDI *et al.*, 2005). Por um lado, é uma espécie que embora se desenvolva entre as latitudes 30° e 45° quer no Hemisfério Norte quer no Hemisfério Sul ela encontra-se principalmente na Bacia Mediterrânica com um clima caracterizado por Verões quentes e secos (DALLMAN, 1998) e, por outro lado, estudos demonstram que existe uma inter-relação entre o clima e a fenologia reprodutiva da oliveira, pelo que, a data de floração da oliveira pode ser considerada um bom indicador de alterações climáticas. A monitorização polínica desta espécie pode, por conseguinte, ser também utilizada para correlacionar fenómenos fenológicos com características climáticas ao considera-se que existe uma inter-relação entre factores ambientais e resposta biológica (OSBORNE, 2000a, 2000b; ORLANDI *et al.*, 2005).

Em suma, a oliveira é uma espécie importante do ponto de vista económico, alergológico e ambiental, o mesmo se pode dizer acerca do seu pólen, uma vez que os resultados da sua monitorização têm aplicação em todos estes campos.

Morfologia do pólen de *Olea*

Em termos morfológicos, o pólen de *Olea europaea* (Figura 1.23) é um pólen trizonocolporado, isopolar, com simetria radial e forma prolada esferoidal. Tamanho pequeno 18-22 µm. Aberturas simples/ compostas, com colpos muito largos, poros não definidos, apreciáveis como uma zona clara no centro dos colpos, com uma membrana apertural granulada. Citoplasma granuloso. A exina é espessa, reticulada; a sexina com columelas é diferenciável da nexina. A intina é fina formando *oncus*. (CAEIRO, 2004).



Figura 1.23: Grão de pólen de *Olea europaea* ao microscópio óptico corado com fucsina básica.

1.3.2.6. Pólen de *Platanus hybrida*

O pólen de *Platanus* encontrado na atmosfera dos locais de estudo pertence à espécie *Platanus hispanica* Miller ex Münchh. (híbrido entre *P. orientalis* L. e *P. occidentalis* L.), única representante da família Platanaceae existente em Portugal (FRANCO, 1984).

Trata-se de uma planta arbórea, utilizada como árvore de sombra ornamental, frequentemente em parques, praças, jardins, passeios, ruas, margens de estradas e margens dos cursos de água, sobretudo em solos um tanto profundos e frescos, onde se encontra às vezes naturalizado. Utiliza-se principalmente pela sua capacidade para tolerar atmosferas muito poluídas, apresentando um rápido crescimento e proporcionando sombra na época estival. Estas qualidades conferem-lhe um grande valor ornamental que justifica a sua ampla distribuição, não só na Península Ibérica, como também noutros países europeus como França, Itália, Suíça, Bélgica e Gran Bretanha (Miranda, 2002), assim como nos Estados Unidos (Lewis *et al.*, 1983) e Argentina (Nitiu & Mallo, 2002).

Como planta anemófila que é, liberta uma grande quantidade de pólen que, apesar da sua pequena dimensão, não se afasta muito das fontes produtoras depositando-se rapidamente no solo com a distância. De acordo com BRICCHI *et al.* (2000) observa-se uma elevada deposição de pólen próximo das plantas e que decresce muito rapidamente a uma distância superior a 400 metros da fonte, seguindo uma função polinomial. Os mesmos autores determinaram que mais de 88% do pólen libertado é depositado a cerca de 2750 metros, contudo, alguns grãos de pólen podem percorrer vários quilómetros de distância da planta (fonte).

O pólen de *Platanus* aparece na atmosfera durante o mês de Março e Abril. A sua presença fora da estação polínica é causada por refluções do pólen depositado na própria planta ou

obstáculos perto da planta. As concentrações atmosféricas deste tipo polínico aumentam numa forma brusca, passando, em poucos dias, de zero grãos por metro cúbico de ar para várias centenas. Fora da estação polínica as concentrações polínicas atingidas são mínimas, praticamente nulas.

De acordo com MINERO & CANDAU (1997) o *taxon Platanus* apresenta um ritmo bianual, fenómeno também referido na bibliografia para outras plantas arbóreas como *Quercus*, *Olea* e *Betula* (JÄGER *et al.*, 1991; LATORRE, 1999; MACCHIA *et al.*, 1987; BELMONTE & ROURE, 1992; DOMINGUEZ-VILCHES *et al.*, 1993; NIEDDU *et al.*, 1997; BRANDÃO, 1996; BRITO *et al.*, 1998), que pode ser resultado dum padrão de produção e emissão polínica regulado por factores endógenos da planta.

Do ponto de vista alergológico, é um pólen importante, apresentando uma alergenicidade moderada (SUBIZA *et al.*, 1995; SUBIZA *et al.*, 1998; MORAL DE GREGORIO *et al.*, 1998). Segundo LORENZONI-CHIESURA *et al.* (2000) este *taxon* arbóreo está classificado dentro do grupo de plantas a evitar nas áreas públicas. Um estudo efectuado em Madrid por SUBIZA *et al.* (1995) mostrou que a percentagem de reacções positivas nas provas cutâneas aumentou 50% ao longo de 15 anos, facto que levou VARELA *et al.* (1997) a citar o pólen de *Platanus* como uma importante causa de polinose em Madrid. Noutros locais de Espanha a percentagem de testes cutâneos positivos foi de 10% em Málaga (BURGOS, 1991), 19% na Ciudad Real (FEO BRITO *et al.*, 1998), 14% em Santander (DE BENITO & SOTO, 2001), 13% na Coruña, 9% em Santiago de Compostela (DOPAZO, 2001), 8% em Barcelona (ENRIQUE *et al.*, 2002) e 52% em Toledo (MORAL *et al.*, 1998). Noutras cidades europeias a percentagem de pessoas com positividade ao respectivo teste cutâneo foi de 13% em Montpellier, 5% em Nápoles (D'AMATO & LOBEFALO, 1989) e 9% na Grécia (GIOULEKAS *et al.*, 2004).

Actualmente, já foram caracterizadas as proteínas alergénicas *Pla a 1* (ASTURIAS *et al.*, 2002) e *Pla a 2* (IBARROLA *et al.*, 2004). A *Pla a 2* causa uma maior percentagem de sensibilização ao pólen de *Platanus*, pois possui um elevado grau de homologia com lipoproteínas de tipos polínicos não relacionados como é o caso de *Betula* (*Bet v 2*), *Phleum* (*Phl p 7*) e *Parietaria* (*Par j 1*) (ASTURIAS *et al.*, 2003; AMORESANO *et al.*, 2003; ARILLA *et al.*, 2006).

Morfologia do pólen de *Platanus*

O pólen de *Platanus* (Figura 1.24), em termos de morfologia, é um pólen trizonocolpado, isopolar, com simetria radial e forma circular (visão polar) a elíptica (visão equatorial) de tamanho pequeno 16-18 μm e aberturas simples, com colpos largos e curtos, de bordos difusos, com uma membrana apertural granulada, verrucosa. O citoplasma é indiferenciável, apresentando uma exina é reticulada com lúmen com $<1 \mu\text{m}$; com uma espessura de 1-2 μm ; tectum parcial, reticulado de lumina pequenos e poligonais, porém, maiores que os muros; as columelas são simples e bem visíveis; a sexina é diferenciável da nexina, de espessura aproximadamente idêntica. A intina com 1 μm de espessura. (CAEIRO, 2004).



Figura 1.24: Grão de pólen de *Platanus hybrida* ao microscópio óptico corado com fucsina básica.

1.3.3. Pólen, Poluição e Polinose

A poluição ambiental é há muito considerada como um problema de Saúde Pública e apesar de cada vez mais existir um melhor controlo, os poluentes ou contaminantes continuam implicados nos problemas de Saúde Pública e, especialmente, nas patologias relacionadas com o aparelho respiratório e no aumento da prevalência e da gravidade das doenças alérgicas (asma, rinite, dermatite atópica), sobretudo nos países industrializados. Esta tendência para o aumento da prevalência e da gravidade das doenças alérgicas atribui-se como sendo consequência da urbanização com os seus elevados níveis de contaminantes ambientais, e de outras causas, agrupadas no chamado “estilo de vida ocidental” (teoria da higiene, genética ou diminuição do tamanho do agregado familiar). Porém, a relação dos contaminantes com o aumento das doenças alérgicas, por vezes, é difícil de valorizar, devido ao efeito adicional de outros factores como, o fumo do tabaco, a exposição a alergénios do interior (ácaros, animais domésticos, fungos, alergénios ocupacionais) ou

de exterior (pólen e esporos de fungos), factores meteorológicos (pressão atmosférica, temperatura, humidade, direcção do vento) e socioeconómicos diversos (D'AMATO *et al.*, 2002; DÍAZ-SÁNCHEZ, 2000; GARTY *et al.*, 1998; ISAAC, 1998).

Os contaminantes ou poluentes mais directamente relacionados com os problemas respiratórios, em particular com a asma, são os produtos derivados da combustão do petróleo e os fumos emitidos pelos veículos automóveis, que libertam principalmente partículas diesel (DEPs), dióxido de azoto (NO_2); e, como consequência das reacções fotoquímicas, o ozono (O_3) (OSTRO *et al.*, 2001; NORRIS *et al.*, 1999; ROMIEU *et al.*, 1995). Estes contaminantes denominam-se do tipo II, pois estão estreitamente ligados aos processos alérgicos e amplificadores da resposta mediada por IgE. Os contaminantes, fumo negro e dióxido de enxofre (SO_2) constituem contaminantes do tipo I, que induzem respostas inflamatórias e irritativas nas vias respiratórias (RING *et al.*, 2001).

O dióxido de azoto (NO_2) é um contaminante habitual do interior das habitações, pois é um importante produto que deriva da utilização de combustíveis fósseis, a sua concentração no interior das habitações está relacionada, por exemplo, com a utilização de gás como fonte de energia e querosene nos aquecedores. No exterior a sua fonte principal é o escape dos automóveis, mas também pode ser proveniente de centrais eléctricas e outras fontes que utilizem combustíveis fósseis. A maioria do NO_2 no ambiente é gerada pela combustão dos combustíveis derivados de fósseis. Estudos demonstram que o NO_2 piora a evolução dos indivíduos com asma, potenciando a sua sensibilidade aos aeroalergénios. Segundo TUNNICLIFFE e colaboradores (1994) o NO_2 aumenta a resposta aos aeroalergénios (ácaros), tanto a resposta imediata como a resposta tardia. A sua elevada capacidade oxidativa altera a integridade das células epiteliais e aumenta a concentração de citocinas proinflamatórias (GM-CSF, IL-8, $\text{TNF}\alpha$).

O ozono (O_3) trata-se de um potente agente oxidante que se forma pela acção da luz solar sobre o NO_2 na presença de hidrocarbonetos. Pode ser transportado a longas distâncias e encontrar-se em elevadas concentrações nas zonas rurais onde não existem percursos de ozono. A sua formação depende das condições meteorológicas e é ótima com temperaturas elevadas, luz solar e ventos suaves, pelo que se admite ser responsável por cerca de 90% dos níveis de oxidantes totais nas localidades da área mediterrânica. Actualmente, na maioria dos países mediterrânicos os níveis estabelecidos pelas normas de segurança para O_3 são ultrapassados com frequência. Do O_3 inalado, aproximadamente 40-60% é absorvido nas vias aéreas superiores e o restante atinge as vias aéreas inferiores. A exposição a ozono provoca no Homem uma resposta irritativa, aumenta a inflamação

das vias aéreas. A exposição mesmo que curta e a pequenas quantidades de ozono reduz a quantidade de alérgénio necessária para provocar uma descida de 15% no FEV₁ (volume expiratório forçado em 1 segundo).

O Dióxido de enxofre (SO₂) deriva da combustão do carvão e do petróleo, assim como da fundição de minerais com enxofre e de indústrias relacionadas com o cimento. Conhece-se muito pouco sobre os mecanismos em que actua o SO₂ no aparelho respiratório, embora pareça actuar na estimulação dos receptores irritativos das vias aéreas superiores, com efeitos bronquiais e cardiovasculares (TUNNICLIFFE *et al.*, 2001) e tem um efeito mais rápido sobre a função pulmonar que os poluentes NO₂ e O₃. Tem um efeito oposto aos restantes contaminantes, por exemplo, diminui o conteúdo alérgénico do pólen de *Phleum pratense* (BHERENDT & BECKER, 2001).

As partículas de matéria (PM) atmosféricas constituem o principal componente de poluição do ar urbano. São uma mistura de partículas de natureza sólida e líquida com diferentes origens, tamanho e composição, e entre estas estão os grãos de pólen, partículas paucimicrónicas de origem vegetal transportadoras de alérgénios (fragmentos polínicos; grânulos de amido; fragmentos de inflorescências, folhas e caules) e os esporos de fungos. As PM₁₀ e as PM_{2,5} (partículas com um diâmetro aerodinâmico de 10 e 2,5 µm) ao serem inaladas podem atingir as vias aéreas inferiores. As PM_{2,5} ficam retidas no parênquima pulmonar, enquanto as restantes de dimensões superiores mas inferiores a 10 µm somente atingem as vias aéreas proximais onde são eliminadas pela limpeza mucociliar se a mucosa se encontrar intacta (BRAIN & VALBERG, 1979; ANDERSON *et al.*, 1994; CHURG & BRAUER, 1997). As PM são o componente mais problemático da poluição do ar e parece ser também o mais associado com os efeitos adversos da poluição na saúde. A poluição do ar por partículas está significativamente associada com aumentos na mortalidade a partir de doenças respiratórias e cardiovasculares, exacerbação de alergias, asma, bronquites crónicas, infecções do aparelho respiratório, visitas aos serviços de urgência e internamentos hospitalares em muitas áreas geográficas (POPE *et al.*, 1995; KATSOUYANNI *et al.*, 1997; SALVI & HOLTGATE, 1999). De acordo com SEATON *et al.* (1995) as PM ao penetrarem em profundidade nas vias aéreas, são capazes de induzir inflamação alveolar que é responsável pela variação na coagulabilidade do sangue e libertação de mediadores que induzem episódios agudos das doenças respiratórias e cardiovasculares. Os efeitos respiratórios talvez se devam à transição dos metais (irídio, crómio, cobalto, cobre, manganês, níquel, titânio, vanádio e zinco) nas partículas que danifica as vias aéreas através da geração de radicais livres de oxigénio (SMITH & AUST, 1997; GHIO & HATCH, 1993;

DONALDSON *et al.*, 1997; COSTA & DREHER, 1997; DREHER *et al.*, 1997; COSTA *et al.*, 1998)

As partículas diesel (DEPs), i.e., partículas que resultam da combustão dos combustíveis diesel e que são libertadas dos veículos automóveis, consistem num núcleo de carbono sobre o qual se depositam 18.000 componentes orgânicos diferentes de elevado peso molecular, os quais, são formados por uma complexa mistura de gases, tais como, monóxido de carbono (CO), óxidos de azoto (NO, NO₂), SO₂, hidrocarbonetos, formaldeído, metais e partículas de carvão. Constituem cerca de 90% das PM atmosféricas e apresentam um grande número de partículas. São as partículas ultrafinas (< 0,05 – 0,10 µm) que mais claramente estão implicadas, no que diz respeito à saúde, pois são altamente reactivas e detectam-se em grande quantidade nos meios urbanos. A sua pequena dimensão permite-lhes atravessar o epitélio e as paredes vasculares, logo, tem efeitos sistémicos como carcinogenicidade (CAMMER *et al.*, 1988), potenciação de doenças autoimunes (YOSHINO & SAGAI, 1999), doenças cardiovasculares ou alteração na coagulabilidade do sangue (SCHWARTZ *et al.*, 1996; SEATON *et al.*, 1995). As DEPs exercem os seus efeitos através da actividade específica de agentes químicos, tais como, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs). As DEPs ao se depositarem na mucosa das vias aéreas e devido à sua natureza hidrofóbica, levam à difusão de PAHs pela membrana celular e ligam-se a um receptor citosólico. Pela subsequente acção nuclear, os PAHs podem modificar os programas de crescimento e diferenciação das células (DIAZ-SANCHEZ *et al.*, 1997; BAYRAM *et al.*, 1998; RUDELL *et al.*, 1990).

EMBERLIN no seu estudo efectuado em 1998 mostrou que a maior epidemia de asma da cidade de Londres, no dia 24 de Junho de 1994 (dia em que coincidiram fenómenos meteorológicos e ambientais), esteve claramente associada à associação entre as DEPs e os pólenes. Sabe-se que as crises de asma são provocadas por níveis elevados de pólen de gramíneas associados a uma elevada concentração de partículas (inferiores a 2,5 µm). Sob condições de chuva e humidade, os pólenes podem libertar pequenas partículas com uma dimensão inferior a 1 µm; quando acontece uma tempestade, ocorre a ruptura, por choque osmótico, dos grãos de pólen e esporos com consequente libertação para a atmosfera de grandes quantidades de inúmeras micropartículas com capacidade alergénica. As DEP, entre 0,05 – 1 µm, têm a capacidade de se ligarem aos aeroalergénios principais dos grãos de pólen, usando o alergénio como transportador e formam “aerossóis alergénicos”, com uma elevada capacidade de penetração no aparelho respiratório, e elevada capacidade para desencadear episódios de asma nos indivíduos sensibilizados (EMBERLEIN, 1998; KNOX *et al.*, 1997). Os grãos de pólen por si só não são participantes passivos na resposta alérgica e juntamente

com as DEPs têm o seu efeito aumentado, argumento que muitas vezes se utiliza para explicar a maior prevalência de polinose nas cidades que nas zonas rurais (BEHRENDT *et al.*, 2001).

Estudos vários têm demonstrado que as DEPs têm a capacidade de actuarem como adjuvantes aos alergénios, aumentando a produção de IgE específica (MURANAKA *et al.*, 1986, KNOX *et al.*, 1997). Adicionalmente, comprovou-se que as DEPs podem potenciar processos alérgicos de forma directa actuando sobre as células B, ou indirectamente através da produção de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) que induzem a expressão de Th0 em Th2 (DÍAZ-SÁNCHEZ, 1997; PRESCOTT *et al.*, 1999).

As DEPs aumentam a resposta mediada por IgE, aumentam a produção de citocinas proinflamatórias, alteram, reduzindo a limpeza mucociliar e afectam a hiperreactividade bronquial dos indivíduos asmáticos (WOLFF, 1986; DEVALIA ET AL., 1997; BAYRAM ET AL., 1998; NORDENHÄLL ET AL., 2001).

Em suma, segundo FEO-BRITO (2003) e D'AMATO *et al.* (2002) a poluição atmosférica pode actuar na indução de alergia respiratória através de distintos mecanismos: 1) efeito irritativo sobre as vias respiratórias; 2) efeito tóxico directo por alteração do epitélio respiratório e, como consequência, inflamação nas vias aéreas; 3) híper-reactividade inespecífica ao alergénio específico através da inflamação das vias aéreas; e 4) modificação da resposta imune, actuando como factor adjuvante, aumentando a resposta mediada pela IgE frente aos alergénios inalados. Segundo os mesmos autores, há evidência de que os indivíduos predispostos e/ ou atópicos são mais susceptíveis aos efeitos adversos dos poluentes, esses indivíduos têm as suas mucosas mais sensíveis e reagem mais facilmente e de uma forma mais intensa que os indivíduos saudáveis.

1.4. A INFLUÊNCIA DOS FACTORES METEOROLÓGICOS SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE PÓLEN ATMOSFÉRICO

A concentração de pólen na atmosfera em qualquer momento é influenciada por factores que influenciam os fenómenos aerobiológicos: produção, libertação, dispersão, transporte e deposição (EDMONDS, 1979; SILVA *et al.*, 2007).

De acordo com KAWASHIMA & TAKAHASHI (1995), se compararmos estudos sobre os efeitos dos parâmetros meteorológicos na dispersão de pólen, parece frequentemente existir uma aparente contradição nos resultados encontrados. Alguns investigadores assumem que existe um padrão básico de ocorrência de pólen no ar, cíclico ou estável, devido à existência das plantas fonte de produção, padrão esse que é de alguma forma independente das alterações das condições externas. Outros investigadores assumem que as flutuações são causadas principalmente pela influencia de factores meteorológicos (PLA-DALMAU, 1961; EDMONDS, 1979; ROSALES, 1985; SPIEKSMAN & TONKELAAR, 1986).

O número de grãos de pólen e o intervalo de tempo da permanência destes na atmosfera depende da fenologia floral das espécies emissoras (JÄGER *et al.*, 1991). Sabe-se também que as condições meteorológicas durante o período de polinização modificam as concentrações polínicas emitidas na atmosfera. Factores endógenos e/ou ambientais determinam a variabilidade interanual da concentração de pólen no ar (LATORRE, 1999), pelo que a forma das curvas polínicas não está sempre de acordo com o desenvolvimento floral.

Factores meteorológicos como precipitação, velocidade e direcção do vento, horas de sol, temperatura e humidade relativa são frequentemente referidos como factores que influenciam as concentrações de pólen no ar (EMBERLIN & NORRIS-HILL, 1996; ALCAZAR *et al.*, 1999).

O comportamento anual dos totais polínicos pode estar relacionado com parâmetros meteorológicos, como já tinha sido referido por PLA-DALMAU (1961), EDMONDS (1979) e ROSALES (1985).

Não é de surpreender que muito do trabalho prévio em Aerobiologia se centre no estabelecimento do papel das condições meteorológicas nas concentrações polínicas, dado que é bem conhecida a influência das condições climáticas directamente sobre a floração, produção de pólen e polinização, pois elas determinam o início da floração, a abundância da vegetação e exercem uma

grande influência sobre a quantidade de pólen diária que as plantas libertam para a atmosfera. De acordo com EDMONDS (1979), as plantas que florescem no Inverno e início de Primavera são influenciadas pela temperatura enquanto as que florescem no final da Primavera e início de Verão sofrem influência simultaneamente da temperatura e fotoperíodo e, finalmente, as plantas que florescem no Verão têm o início da sua polinização dependente unicamente do fotoperíodo. Também todos estes estudos têm contribuído para perceber o efeito das variáveis meteorológicas na produção e dispersão de pólen e têm ajudado na construção de modelos de dispersão de pólen e sistemas de previsão polínicos (NORRIS-HILL, 1997). No caso das gramíneas tem existido uma certa dificuldade no desenvolvimento de modelos de previsão a médio e a longo prazo. As contagens deste tipo polínico correspondem a uma amalgama de pólen de muitas espécies pelo que a dinâmica de libertação dos grãos de pólen conduz a uma curva com inúmeros picos (FÉRNANDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 1999; EMBERLIN *et al.*, 1999), sendo o resultado da existência de inúmeras espécies de gramíneas com floração distribuída ao longo de todo o ano, cada uma com uma fenologia particular.

Uma particularidade importante e extremamente interessante, segundo alguns estudos, é que o pólen de gramíneas tem um papel etiológico na asma epidémica associada a perturbações/fenómenos meteorológicos, particularmente trovoadas e chuvas torrenciais (EMBERLIN, 1998; GROTE *et al.*, 2001; MARKS *et al.*, 2001).

Outro factor que não foi aqui analisado e que nos últimos anos tem sido referido por alguns investigadores (GARCÍA-MOZO *et al.*, 2010) como um factor que pode também influenciar a aumento da produção de pólen na planta, bem como, a subsequente libertação de pólen atmosférico, é o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera. Dados científicos (LADEAU & CLARK, 2006; ROGERS *et al.*, 2006; SINGER *et al.*, 2005; ZISKA *et al.*, 2003; ZISKA & CAULFIELD, 2000) sugerem que o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera para além de aumentar e acelerar o desenvolvimento vegetativo também aumenta a produção de pólen, maioritariamente, devido ao aumento do n.º de flores, e a potência alergénica.

Os efeitos directos dos factores meteorológicos sobre as concentrações de pólen atmosféricas são geralmente estudadas através da determinação de correlações entre os valores diários das concentrações atmosféricas das partículas biológicas e os valores diários dos factores meteorológicos, entre os quais, os mais frequentemente utilizados são as temperaturas do ar (temperatura máxima, média e mínima), a humidade relativa, a radiação global, o número de horas de insolação, os períodos de calma, a velocidade e a direcção do vento. Geralmente, nestas análises

utiliza-se apenas o período da EPAP. Na interpretação dos resultados tem que se ter sempre em conta como as condições meteorológicas afectam quer a fisiologia de libertação das partículas a partir dos organismos, quer o fenómeno de transporte.

Temperatura

A temperatura é considerada um dos principais parâmetros meteorológicos que controla a floração e a produção de pólen (CARAMIELLO *et al.*, 1991, 1994; EMBERLIN *et al.*, 1993; MORENO-GRAU *et al.*, 2000). De acordo com MOSEHOLM *et al.* (1987), o desenvolvimento dos grãos de pólen no interior das anteras a partir das células-mães dos grãos de pólen é um processo que é dependente em muitas plantas da temperatura.

Também de acordo com CADMAN *et al.* (1994), a influência da temperatura como factor controlador da intensidade da polinização é superior durante o Verão, quando as árvores produzem e acumulam maiores quantidades de produtos fotossintéticos que serão úteis na reprodução durante a Primavera.

É também já do conhecimento de todos que as espécies arbóreas com uma floração padrão Inverno-Primavera têm uma “necessidade” pelo frio relacionada com o período de dormência (FRENGUELLI *et al.*, 1991; EMBERLIN *et al.*, 1993) e que após esse período de dormência necessitam de proceder a uma acumulação de calor para iniciarem a floração e libertação de pólen (SEELEY *et al.*, 1997; FRENGUELLI & BRICCHI, 1998).

Dada a importância deste parâmetro meteorológico, a temperatura é um dos parâmetros que mais frequentemente é utilizado nos modelos fenoclimáticos de previsão do início de polinização de várias espécies (FRENGUELLI & BRICCHI, 1998).

Humidade relativa

Como refere RODRÍGUEZ-RAJO (2000) a humidade relativa provoca a hidratação tanto das paredes do grão de pólen como das paredes das anteras dificultando a passagem dos grãos de pólen para a atmosfera. Segundo SILVA *et al.* (2007), as anteras não abrem quando a humidade ambiental é elevada.

Precipitação

A precipitação poderá ser outro factor que influencia a elevada produtividade das árvores (CARAMIELLO *et al.*, 1994). Nos ecossistemas mediterrânicos, a possibilidade de utilização de água desempenha um papel importante na determinação do desenvolvimento fenológico (SPANO & CESARACCIO, 1998). Por outro lado, a precipitação é também muito importante durante o período em que os grãos de pólen permanecem no ar. Muitos investigadores estudaram a influencia da precipitação nas concentrações polínicas e concluíram que a relação é simples e negativa, isto é, a precipitação, provoca a “lavagem” da atmosfera, arrastando consigo as partículas que se encontram em suspensão na atmosfera, entre as quais se encontram os grãos de pólen, levando à sua sedimentação e, por outro lado, impede a libertação dos grãos de pólen das plantas (HYDE, 1952; MCDONALD, 1980; CABEZUDO *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1999a; 1999b; RODRÍGUEZ-RAJO, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2003). O efeito de “lavagem” do pólen da atmosfera é influenciada pelo tamanho dos grãos de pólen. Os grãos de pólen de maiores dimensões são removidos do ar de uma forma mais rápida que os grãos de pólen de reduzidas dimensões. O grão de pólen mais pequeno do espectro polínico, o de *Urtica*, é geralmente observado em concentrações elevadas durante a precipitação comparativamente com os grãos de maiores dimensões, como por exemplo de Poaceae (MOORE & WEBB, 1978), e este padrão de lavagem é observado na maioria dos eventos de precipitação.

PINAR *et al.* (2000) refere que a pluviosidade, quando anterior à floração, aumenta a intensidade desta. Portanto, a precipitação no Outono e Inverno causa o desenvolvimento das plantas e aumenta a intensidade da floração na Primavera, observação também referida pelos investigadores SILVA *et al.* (2007); já a precipitação na Primavera causa o desenvolvimento das plantas herbáceas e aumenta a intensidade de floração na Verão. Alguns autores, tais como SILVA *et al.* (1999a; 1999b; 2007) referem que as chuvas primaveris aquando a polinização de alguns *taxa* têm um efeito negativo sobre esta (ex.: polinização do género *Quercus*) facto também já assinalado por KÄPYLÄ (1984) e RECIO *et al.* (1999). Outros autores como HYDE & WILLIAMS (1946) não observaram esse efeito negativo em relação à taxa de polinização do *Plantago*, nem em relação à antese floral, durante os dias de chuva. IGLESIAS *et al.* (1998) e SCHÄPPI *et al.* (1998), em Melbourne, interpretaram a influencia da precipitação nas Poaceae como um efeito indirecto através das temperaturas, que se reduzem quando chove.

Radiação solar

De acordo com MORENO-GRAU *et al.* (1998, 2000), trata-se de uma variável importante, dado que induz à deiscência das anteras e alongamento do filamento do estame juntamente com a diminuição da **humidade relativa**.

Velocidade do vento e períodos de calma

O efeito dos períodos de calma e da velocidade do vento podem ser explicados de várias maneiras. Por exemplo, a proximidade das fontes relativamente ao local de amostragem é, geralmente, relacionada positivamente com os períodos de calma e negativamente com a velocidade do vento, porque os ventos diluem as concentrações de pólen atmosféricas (SILVA *et al.*, 2007).

O vento actua como um agente de transporte e de difusão dos grãos de pólen para lugares longínquos da amostragem ou como um agente de diluição das concentrações polínicas na atmosfera (SILVA *et al.*, 2000; MORENO-CORCHERO, 2001).

Direcção do vento

A **direcção do vento** têm um papel importante na determinação da concentração polínica na atmosfera quando as fontes polínicas estão localizadas em certos direcções/ quadrantes (SILVA *et al.*, 2000; MORENO-CORCHERO, 2001; CAEIRO, 2004).

Muitos estudos interpretam a relação entre as concentrações de partículas e as diferentes direcções do vento de acordo com a posição relativa das fontes relativamente ao colector. Para as plantas com uma maior distribuição em redor do colector o efeito da direcção do vento não é importante. Pode ser usado para estabelecer a localização da fonte de partículas quando esta se desconhece (SILVA *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICAÇÃO E OBJECTIVOS DO ESTUDO

2.1. JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO

De acordo com um relatório da Organização Mundial de Saúde [WHO, Roma,2003], as prevalências da asma, rinite alérgica, conjuntivite alérgica e eczema aumentaram durante a 2ª metade do século XX. A sensibilização aos alergénios contidos no pólen também aumentou em muitas áreas na Europa. Na área mediterrânea aumentou a sensibilização ao pólen de *Olea europaea* L. e de maneira geral nas zonas urbanas aumentou a sensibilização ao pólen de *Platanus* spp. e ao de Cupressaceae/ Taxaceae. De acordo com o mesmo relatório, prevê-se que a incidência de polinose venha a aumentar na Europa nos próximos dez anos devido a múltiplas causas interactivas sem que, no entanto, se preveja uma mudança das medidas de prevenção primárias em tão curto espaço de tempo.

Vários estudos mostram que os mapas polínicos na Europa estão a sofrer alterações, como resultado de factores climáticos, factores culturais (ex.: importação de plantas nos parques urbanos) e à expansão do comércio internacional (ex.: expansão da área de distribuição de *Ambrosia* spp.). Importa verificar a extensão do fenómeno a Portugal, nomeadamente à região sul onde os vários estudos sobre alterações climáticas referem como sendo a região onde mais se irá fazer sentir o seu impacto.

Estudos aerobiológicos realizados até à data em Portugal, com metodologia gravimétrica tipo Durham, evidenciaram claramente a relação entre os níveis de Poaceae e *Olea europaea* L. no desencadeamento e agravamento das manifestações sintomatológicas em doentes residentes no sul do País [LOPES et al., 1995]. Não estão clarificados nestas populações quais os factores que interactivam com o sistema de relações tais como estilo de vida, duração da estação polínica, presença de poluentes, etc;

Este trabalho surgiu na sequência da implementação da Rede Portuguesa de Aerobiologia (RPA) e, deste modo, foi possível, por um lado, analisar e comparar os dados das diferentes regiões situadas a sul do País: Lisboa, Évora e Portimão, regiões diferentes do ponto de vista tanto climático como biogeográfico, e, por outro lado, estudar o comportamento interanual e intradiário de três tipos polínicos considerados com importantes propriedades alergizantes: Poaceae, *Olea europaea* e *Platanus*, na atmosfera dessas regiões.

Este estudo, contou com o apoio da Consulta Externa de Imunoalergologia, na Unidade hospitalar de Évora – Hospital do Espírito Santo de Évora – E.P.E., através da Dr.^a Maria Luisa Lopes (Imunoalergologista). Esse apoio veio possibilitar a análise de uma possível relação entre os sintomas dos doentes com polinose com as contagens dos pólenes alergizantes. Também foi possível analisar a existência dessa relação, porém, de uma forma indirecta, através dos dados das vendas de antihistaminicos disponibilizadas pelo INFARMED.

2.2. OBJECTIVOS DO ESTUDO

2.2.1. Objectivo geral

- Analisar a aerobiologia do Sul de Portugal, particularmente a aerobiologia dos pólenes atmosféricos de Poaceae, *Olea europaea* e *Platanus hybrida* e a relação entre as suas concentrações diárias atmosféricas e a sintomatologia de doentes residentes no sul de Portugal com doença alérgica respiratória.

2.2.2. Objectivos específicos

- Determinar o calendário polínico de cada uma das 3 localidades de estudo: Lisboa, Évora e Portimão;

- Comparar o conteúdo polínico da atmosfera de Lisboa, Évora e de Portimão durante os anos de estudo (2002-2008);

- Analisar o comportamento interanual e intradiário de três tipos polínicos considerados com importantes propriedades alergizantes: Poaceae, *Olea europaea* e *Platanus* nas três estações de monitorização;

- Analisar a variação interanual dos factores meteorológicos durante os anos de estudo;

- Analisar a influência dos factores meteorológicos sobre as concentrações diárias polínicas atmosféricas dos pólenes de Poaceae, *Olea europaea* e *Platanus hybrida* das três estações de monitorização;

- Analisar os testes cutâneos de alergia em todos os doentes seleccionados da Consulta Externa de Imunoalergologia do Hospital do Espírito Santo de Évora – E.P.E. manifestando queixas de polinose;

- Analisar os inquéritos sintomatológicos padronizados (registos diários dos sintomas: espirros, rinorreia, obstrução nasal, prurido nasal, lacrimejo, prurido ocular, inflamação ocular, pestanas coladas e respiração sibilante e respectivo grau de intensidade (0 – ausente; 1- ligeiro; 2 – moderado e 3 – intenso) preenchidos pelos doentes durante a estação primaveril: 1 de Março a 30 de Junho durante os anos 2001 – 2007;

- Analisar a correlação entre os sintomas dos doentes e as contagens polínicas dos pólenes de Poaceae, Olea e Platanus, e analisar a existência dessa relação, de uma forma indirecta, através dos dados das vendas de antihistaminicos disponibilizadas pelo INFARMED;