

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Estudo de reactividade cruzada entre alergénios de *Salsola kali* e de *Olea europaea*

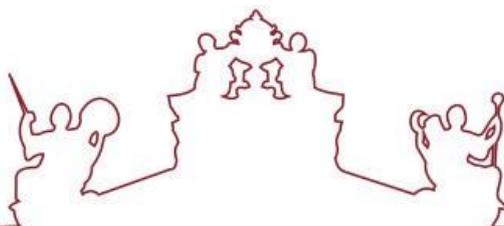
Pedro Miguel Parreira Machado Canaveira Alves

Orientador(es) | Célia Maria Miguel Antunes

Ana Cristina Bugalho Oliveira Rodrigues Costa

Évora 2020





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Estudo de reactividade cruzada entre alergénios de *Salsola kali* e de *Olea europaea*

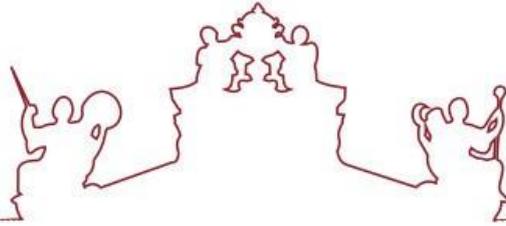
Pedro Miguel Parreira Machado Canaveira Alves

Orientador(es) | Célia Maria Miguel Antunes

Ana Cristina Bugalho Oliveira Rodrigues Costa

Évora 2020





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

Presidente | António Paulo da Silva Teixeira (Universidade de Évora)

Vogais | Célia Maria Miguel Antunes (Universidade de Évora) (Orientador)
Rui Manuel Alves Ferreira (Universidade de Évora) (Arguente)

Évora 2020



Pedro Miguel Parreira Machado Canaveira Alves

Sensibilização a *Salsola kali* e *Olea europaea*: Estudo de reatividade cruzada

Apoios



Instituto de Ciências da Terra



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



Este trabalho é financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) através do projeto do ICT (Instituto de Ciências da Terra) UIDB/04683/2020 (ref. POCI-01-0145-FEDER-007690), e do projeto *Pollensorb* (PTDC-ATPEAM/0817/2014).

Agradecemos também à Prof, Rosa Perez-Badia, Universidade de *Castilla La-Mancha* (UCLM), Espanha, e à Dra. Ana Burgos do Hospital de *Alcazar de San Juan*, *Castilla La-Mancha*, Espanha, pela disponibilização dos soros para este estudo.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Escola de Ciência e Tecnologia da Universidade de Évora, pela oportunidade que me foi dada para adquirir conhecimentos e crescer enquanto pessoa para perspectiva de um melhor futuro.

Quero agradecer às minhas orientadoras, Professora Doutora Célia Antunes e Ana Costa por todos os conhecimentos transmitidos, apoio, compreensão, críticas e disponibilidade, durante todo o tempo.

Quero agradecer à Ana Galveias, por toda a ajuda na realização deste trabalho, paciência e motivação para a continuação do trabalho.

Quero agradecer aos meus pais, à minha irmã e à minha avó, por todo o apoio, incentivo e perseverança que me transmitiram desde o dia que entrei para a Universidade de Évora.

Índice

Apoios	7
Agradecimentos	8
Índice.....	9
Índice de Figuras.....	11
Índice de Tabelas	12
Abreviaturas e Unidades	13
Resumo.....	15
Abstract	16
1. Introdução.....	18
1.1. Alergia e as reações de hipersensibilidade.....	18
1.2. Imunoglobulinas: classificação e caracterização.....	20
1.3. Reatividade Cruzada.....	24
1.4. Alergia ao pólen.....	25
1.5. O pólen: Características morfológicas e estruturais.....	27
1.5.1. Tipos polínicos presentes na Península Ibérica	29
1.6. Métodos utilizados no estudo dos perfis proteicos e de alergénios dos pólenes	36
1.6.1. A técnica de eletroforese em SDS-PAGE.....	36
1.6.2. A eletroforese 2D.....	37
1.6.3. As técnicas de <i>immunoblotting</i>.....	38
2. Problemática e Objetivos.....	41
3. Metodologia	42
3.1. Material, equipamento e reagentes.....	42
3.2. Caracterização da população em estudo	42
3.3. Preparação dos Extratos	43
3.4. Quantificação do conteúdo proteico total pelo método do ácido bicinconínico (BCA).....	43
3.5. <i>Western blott</i> para identificação dos alergénios.....	45
3.5.1. SDS-PAGE dos extratos polínicos.....	45
3.5.2. Eletrotransferência	46
3.5.3. Imunodeteção.....	47

4.	Resultados e Discussão.....	51
4.1.	Identificação e caracterização dos alérgenos Profilina, Polcalcina e Ole e 1 e Ole e 1 like nos extratos polínicos de <i>S. kali</i> e <i>O. europaea</i>.....	51
4.2.	Estudo de alergogramas obtidos com pools de soros.....	54
4.3.	Estudo da reatividade cruzada entre <i>O. europaea</i> e <i>S. kali</i>.....	58
5.	Conclusões.....	69
6.	Referências Bibliográficas.....	70
	Sites Consultados.....	71
	Anexos.....	72
	Anexo I.....	72
	a) Material/Equipamento e Reagentes.....	72
	b) Soluções utilizadas.....	73
	Anexo II.....	75

Índice de Figuras

Figura 1 - A hipersensibilidade tipo I (também chamada de hipersensibilidade imediata). Adaptado de (Focus & Disorders, 2019).	19
Figura 2 - Micrografia, obtida por microscopia eletrónica, de partícula de pólen.	27
Figura 3 - Esquema representando as estruturas num grão de pólen.....	28
Figura 4 - Espectro polínico na região de Évora (PolenAlert – [1] https://lince.di.uevora.pt/polen/index.jsp). Dados obtidos na estação polínica PTEVOR, instalada na plataforma de observações atmosféricas do ICT, Évora.....	30
Figura 5 - Fotografia de uma planta <i>S. kali</i> (obtido em [2]).....	31
Figura 6 - Fotografia de uma árvore <i>Olea europaea</i> (obtido de [2]).....	33
Figura 7 - Estrutura da "Sandwich". Adaptado de (Kurien & Scofield, 2015).	46
Figura 8 - Imagem da membrana de <i>Western blot</i> com identificação de Ole e 1 e Ole e 1-like. Marcação imunológica de acordo com a seção 3.5.3.1. (n= 2).	51
Figura 9 - Imagem da membrana de <i>Western blot</i> com identificação de profilina. A membrana foi incubada com anti-profilina. O – Oliveira; S – Salsola (n=1).	52
Figura 10 - Imagem da membrana de <i>Western blot</i> com identificação de Profilina. A membrana de PVDF, sendo a membrana incubada com anti-polcalcina. (N=1).	53
Figura 11 - Imagem das membranas de <i>Western blot</i> , de EPP de <i>S. kali</i> (a) e <i>O. europaea</i> (b). Os blots são representativos de duas experiências independentes.....	54
Figura 12 - Massas moleculares e densidades das bandas proteicas imunorreativas ao EPP de <i>S. kali</i> . Representativo de N=2 experiências.	55
Figura 13 - Massas moleculares e densidades das bandas proteicas imunorreativas do EPP de <i>O. europaea</i> . Representativo de N= 2 experiências.	56
Figura 14 - Imagem dos alergogramas individuais obtidos para <i>S. kali</i> . Em Ini. apresentam-se resultados para os soros não inibidos (-) e previamente inibidos com EPP de <i>O. europaea</i> (+). A primeira lane mostra o padrão de massas moleculares.	59
Figura 15 - Densidade das bandas reconhecidas em EPP de <i>S. kali</i> . Resultados obtidos de 2 experiências independentes.....	61
Figura 16 - Imagem dos alergogramas individuais obtidos para <i>O. europaea</i> . Em Ini. apresentam-se resultados para os soros não inibidos (-) e previamente inibidos com EPP de <i>S. kali</i> (+). A primeira lane mostra o padrão de massas moleculares.....	64
Figura 17 - Densidade das bandas reconhecidas em EPP de <i>O. europaea</i> . Resultados obtidos de 2 experiências independentes.	66

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação das imunoglobulinas existentes e respetivas estruturas, adaptado de (Focus & Disorders, 2019).....	23
Tabela 2 - Alergénios identificados em pólen de <i>S. kali</i>	32
Tabela 3 - Alergénios identificados em pólen de <i>O. europaea</i>	35
Tabela 4 - Níveis de IgE total e de IgE específicas serológica dos indivíduos alérgicos envolvidos neste estudo.....	42
Tabela 5 - Massa molecular obtida para Ole e 1 e Ole e 1-like.....	52
Tabela 6 - Valor de massa molecular obtido para a profilina em <i>S. kali</i> e <i>O. europaea</i> .52	
Tabela 7 - Valor de massa molecular obtido para polcalcina em <i>S. kali</i> e <i>O. europaea</i> .53	
Tabela 8 - Análise descritiva dos alergogramas. Individuais a EPP de <i>S. kali</i>	59
Tabela 9 - Percentagens de redução da densidade das bandas (inibição) de <i>S. kali</i> , reconhecidas por cada um dos soros, após tratamento destes com EPP de <i>O. europaea</i>	61
Tabela 10 - Análise descritiva dos alergogramas. Individuais a EPP de <i>O. europaea</i> . ..	65
Tabela 11 - Percentagens de redução da densidade das bandas (inibição) de <i>O. europaea</i> , reconhecidas por cada um dos soros, após tratamento destes com EPP de <i>S. kali</i>	66

Abreviaturas e Unidades

Em primeira instância irão ser apresentadas as abreviaturas mencionadas ao longo da dissertação, seguindo-se as unidades também referidas.

Acris/Bis: Acrilamida/Bisacrilamida

APS: Persulfato de amónio

AR: Rinoconjuntivite Alérgica

BCA: Soro de albumina bovina

EPP: Extrato polínico proteico

IEF: Focagem isoeletrica

IgA: Imunoglobulina A

IgE: Imunoglobulina E

IgD: Imunoglobulina D

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

kDa: KiloDaltons

Lys: Lisina

PHSF: Fluoreto de fenilmetilo

pI: Ponto isoeletrico

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

SDS: Duodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

TBS: Tampão salino Tris-HCl

TBS-T: Tampão salino Tris-HCl com Tween

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina

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

Pedro Miguel Parreira Machado Canaveira Alves

Sensibilização a *Salsola kali* e *Olea europaea*: Estudo de reatividade cruzada

Tris-HCL: 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

Val: Valina

Sensibilização a *Salsola kali* e *Olea europaea*: Estudo de reatividade cruzada

Resumo

A alergia é uma resposta imunológica do organismo que consiste na atividade exacerbada da IgE contra antígenos não patogénicos, nomeadamente, a alérgenos de pólen.

Neste estudo, foi avaliada a probabilidade de ocorrência de reatividade cruzada entre *Salsola kali* e *Olea europaea*, através do estudo da imunorreatividade de soros de indivíduos sensibilizados a salsola ou a oliveira ou sensibilizados a ambas.

Com recurso a *Western Blotting*, identificou-se Ole e 1-like em *S. kali*, Ole e 1 em *O. europaea*, e profilina e polcalcina em ambas as espécies. Os alérgogramas dos diferentes grupos mostraram imunorreatividade a diversos alérgenos, tendo-se registado reatividade cruzada evidenciada pela identificação de alérgenos homólogos entre espécies ou que apresentem semelhança.

Este estudo evidenciou a existência de reatividade cruzada entre a *S. kali* e a *O. europaea*, sugerindo que os indivíduos sensibilizados podem sofrer de sintomas de alergia fora da época de polinização da espécie para a qual possuem IgE específicas.

Palavras-Chave: Alergia; alérgenos; *Salsola kali*; *Olea europaea*; SDS-PAGE; Imunomarcção; Reatividade Cruzada;

Sensitization to *Salsola kali* and *Olea europaea*: Cross-reactivity study

Abstract

Allergy is an immune response of the body that consists of an exacerbated activity of IgE against non-pathogenic antigens, namely pollen allergens.

In this study, the existence of cross-reactivity between *Salsola kali* and *Olea europaea* was evaluated by studying the immunoreactivity of sera from individuals sensitized to salsola, to olive or sensitized to both pollinic types.

Using Western Blotting, Ole 1-like was identified in *S. kali*, Ole e 1 in *O. europaea*, and profilin and polycalcine were identified in both species. The allergograms of the different groups showed immunoreactivity to different allergens, with cross-reactivity being evidenced by the identification of homologous allergens between species or or among those with structural similarity.

This study showed the existence of cross reactivity between *S. kali* and *O. europaea*, suggesting that sensitized individuals may suffer from allergy symptoms outside the pollination period of the species for which they have specific IgE.

Key-Words: Allergy; allergens; *Salsola kali*; *Olea europaea*; SDS-PAGE; Immunostaining; Cross Reactivity;

Pedro Miguel Parreira Machado Canaveira Alves

Sensibilização a *Salsola kali* e *Olea europaea*: Estudo de reatividade cruzada

1. Introdução

1.1. Alergia e as reações de hipersensibilidade

A hipersensibilidade é definida como a resposta imunitária adaptativa (específica) a um antígeno, o qual pode provocar danos em tecidos. A resposta imunitária adaptativa é distinta da inflamação inespecífica ou imunidade inata, devido a ser necessário um período de latência, o qual possui 2 fases distintas.

Na primeira fase, tem-se a indução de sensibilização, a qual requer a exposição ou acumulação do agente sensibilizante de forma a induzir uma resposta imunitária, o que por sua vez vai resultar no desenvolvimento de um anticorpo específico para o antígeno e proliferação de linfócitos T. Nesta fase os sintomas não são observáveis (Burlison, Johnson, & States, 2018).

A segunda fase é conhecida como eliciação (fase efetora) e ocorre em indivíduos sensibilizados após a exposição ao antígeno o que, por sua vez, irá desencadear uma resposta adversa, resultando em danos nos tecidos e inflamação. As respostas durante estas duas fases são diferentes sendo que não estão relacionadas entre si (Burlison et al., 2018).

Existem xenobióticos que atuam como alérgenos. Incluem proteínas que induzem a resposta imunitária por si mesmos e substâncias químicas de baixo peso molecular conhecidas como haptenos. Os haptenos não geram por si mesmo uma resposta de hipersensibilização, mas, se covalentemente ligados a uma proteína, como a albumina, já o podem fazer (Burlison et al., 2018).

As reações de hipersensibilidade foram sub-divididas em quatro tipos (I-IV), com base no mecanismo imunológico subjacente. A hipersensibilidade do tipo I é mediada pelo anticorpo citofílico específico do antígeno, o qual se liga aos mastócitos e basófilos. A hipersensibilidade do tipo II resulta da citotoxicidade mediada por anticorpos, que ocorre quando as imunoglobulinas IgG ou IgM são geradas para antígenos da superfície celular ou para haptenos ligados à superfície celular. A hipersensibilidade do tipo III é o resultado de complexos antígeno-anticorpo (IgG ou IgM) que se acumulam nos tecidos ou na

circulação, de forma a ativar os macrófagos, desencadeando o influxo de granulócitos e linfócitos devido à inflamação existente. Por fim as reações de hipersensibilidade do tipo IV são mediadas por células T ativadas e não por anticorpos. Estas reações dividem-se em 3 tipos, sendo mediadas por diferentes populações de células T: células auxiliares T (CD4p Th1, CD4p Th2 e CD8p) (Burlison et al., 2018).

A hipersensibilidade do tipo I é causada pela produção e atividade anormal da IgE contra antígenos não patogénicos (Figura 1). Esta hipersensibilidade é considerada imediata devido à velocidade da reação. Os mastócitos e os basófilos possuem recetores de alta afinidade para IgE, onde estes se ligam (Focus & Disorders, 2019). A exposição antigénica resulta numa reticulação da IgE, já ligadas às células, com o alérgeno, seguindo-se uma ativação celular, o que resulta numa libertação rápida de mediadores inflamatórios (nomeadamente histamina, leucotrienos, quimiotaxias e citocinas). A atividade destes mediadores é responsável pelos sintomas característicos das doenças alérgicas.

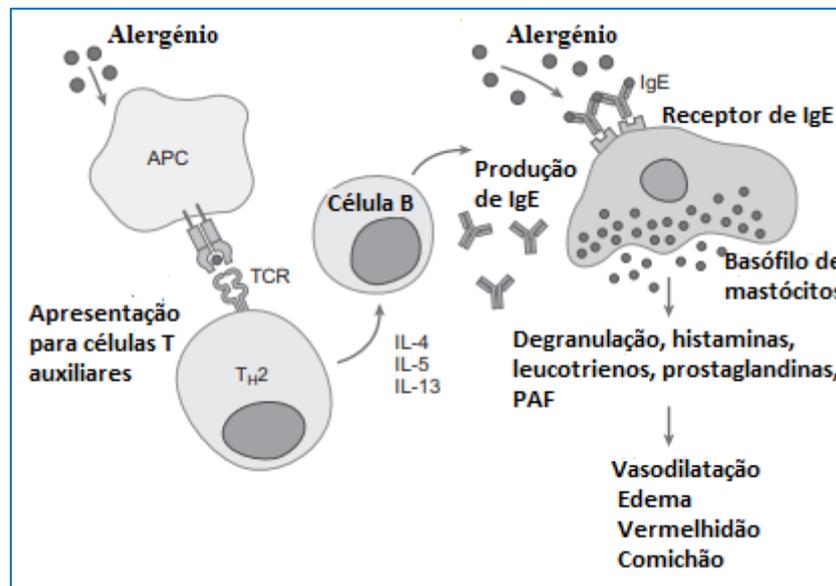


Figura 1 - A hipersensibilidade tipo I (também chamada de hipersensibilidade imediata). Adaptado de (Focus & Disorders, 2019).

Para que exista qualquer tipo de reação do tipo I (Figura 1), tem de existir uma população IgE específica pré-existente para o alérgeno em questão (Grattan, 2005). A reação de hipersensibilidade tipo I é desencadeada por citocinas (como a interleucina-3,

interleucina-4 e a interleucina-13), as quais promovem a geração de células plasmáticas, que produzem anticorpos do isótipo IgE (Focus & Disorders, 2019). Os distúrbios deste tipo de sensibilização incluem rinoconjuntivite alérgica e asma alérgica, entre outros.

Entre os principais tipos de alergénios podem encontrar-se os pólenes, provenientes das mais diversas espécies de flora, esporos de fungos, ácaros e outros tipos de antigénios comuns.

1.2. Imunoglobulinas: classificação e caracterização

As imunoglobulinas são glicoproteínas, presentes no plasma sanguíneo. Estas podem existir livres, em circulação, ou estar inseridas na membrana plasmática dos linfócitos B, ligadas aos seus recetores (Walther, Rusitzka, Diesterbeck, & Claus-peter, 2015). As imunoglobulinas são utilizadas pelo sistema imunitário para neutralizar corpos estranhos, nomeadamente bactérias, vírus, entre outros.

As imunoglobulinas são constituídas por unidades estruturais básicas, as quais têm 2 grandes cadeias pesadas e 2 cadeias leves de menor massa molecular. Estas podem aparecer em separado, como monómeros, ou então associarem-se entre si dando origem a dímeros (2 unidades) ou podem dar origem a pentâmeros (5 unidades) (Flicker et al., 2015). As imunoglobulinas são sintetizadas por linfócitos B. As classes de imunoglobulinas existentes são a IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Tabela 1).

A IgA é a classe de anticorpo predominante nas secreções das mucosas (Tabela 1), sendo que cerca de 80% das células plasmáticas estão localizadas na lâmina do intestino, onde existe uma maior produção de IgA do que os restantes isótipos de Ig combinados (Suzuki & Fagarasan, 2016). As células plasmáticas segregam IgA geralmente como dímeros, após a associação com a cadeia de ligação (cadeia J). Os complexos da cadeia libertados pelas células plasmáticas na mucosa sub-epitelial são transportados para o lúmen intestinal através de células epiteliais, anexando-se ao recetor polimérico (Suzuki & Fagarasan, 2016). A produção de IgA é dependente de bactérias, pois a IgA da mucosa está ausente em animais livres de germes e é rapidamente induzida

após a colonização por bactérias. A IgA também pode ser produzida por células T. A IgA possui, assim, um papel bastante importante na neutralização de vírus e toxinas (libertadas por bactérias patogénicas), na regulação de organismos microbianos no intestino no estado estacionário e também no reconhecimento de antígenos (Suzuki & Fagarasan, 2016).

A IgM é uma imunoglobulina com um peso molecular de 990 kDa (Tabela 1), que tem um papel direto no combate às infeções microbianas, assim como um papel regulador (Heyman, 2016). A IgM é produzida pelos mais diversos vertebrados estudados, sendo que de espécie para espécie possui as mais diversas diferenças, como a estrutura entre outros. A IgM pode apresentar uma estrutura de pentâmero, a qual é constituída por 5 unidades de monómeros, sendo cada um destes é um análogo de IgG, ou seja, cada subunidade é composta por 2 hetero-dímeros, estando cada um incluído na cadeia pesada (Heyman, 2016). As cadeias de monómeros estão ligadas entre si através de ligações dissulfureto.

A imunoglobulina IgD foi descoberta em 1965 por *Rowe e Fahey*, estes encontraram uma proteína de mieloma humano com propriedades incomuns (Tabela 1). Também foram encontradas pequenas quantidades de imunoglobulina do mesmo tipo no soro humano normal (Thomson & British, 2016). Posteriormente, imunoglobulinas designadas de IgD foram encontradas em todas as espécies de mamíferos e aves. A IgD humana é um monómero de 175 kDa com 9% de resíduos glucídicos. A cadeia pesada humana tem três domínios e uma região de dobradiça incomumente longa, que é altamente sensível à proteólise. A cadeia leve é mais curta e falta-lhe um domínio correspondente ao C_δ2 humano. Esta possui um domínio transmembranar e uma curta extensão intracitoplasmática com a sequência Lys-Val-Lys, análoga à da forma de membrana da cadeia μ (Batanero, Crespo, Monsalve, Villalba, & Rodríguez, 1999).

A IgG é composta por duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves também idênticas (Tabela 1), sendo que cada cadeia pesada tem 50 kDa de tamanho e em um domínio variável, possuindo 3 domínios contantes (CH1, CH2 E CH3) (Focus & Disorders, 2019). De referir ainda que cada cadeia leve possui uma massa molecular de

25 kDa e consiste em num domínio variável e num domínio constante, possui um isótopo podendo este ser *kappa* (k) ou *lambda* (l). As cadeias estão ligadas entre si com recurso a ligações dissulfureto. Esta possui 4 variantes ou subclasses, denominada por IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que possuem respetivamente um teor total de 70, 16, 10 e 4% da IgG. Todas possuem a habilidade para atravessar a placenta. É o anticorpo principal nas respostas imunitárias secundárias (Olivieri & Deza, 2018).

A IgE, possuindo cadeias pesadas *epsilon*, sendo o menor componente das imunoglobulinas séricas (Tabela 1). A IgE existe como monómero, com um domínio extra na região Fc, importante para a ligação aos mastócitos. A IgE, como outras imunoglobulinas, consiste em duas cadeias pesadas e duas leves, a especificidade do isótopo residindo na região constante (épsilon) da cadeia pesada. Possui um peso molecular total de 188 kDa, do qual 12% consiste em unidades de oligossacarídeos ligadas aos três primeiros domínios de proteínas da região constante (Ribatti, 2016). A primeira sequência de aminoácidos foi determinada por *Von BahrLindtröm* e *Bennich* em 1974. A IgE compartilha 30% de homologia de aminoácidos com a IgG, apesar de diferir em diversos aspetos, devido a não fixar o complemento ou participar em reações de aglutinação. Também é termolábil, pois a atividade de recuperação é destruída após o aquecimento a 56 ° C por 30 minutos. Não há evidência para a existência de subclasses de IgE, como existe para a IgG e a IgA (Ribatti, 2016).

Tabela 1 - Classificação das imunoglobulinas existentes e respetivas estruturas, adaptado de (Focus & Disorders, 2019).

Imunoglobulina	Estrutura	Esquema
IgA	Dimérica Monomérica	
IgD	Monomérica	
IgE	Monomérica	
IgG	Monomérica	
IgM	Monomérica Pentamérica	

A IgE está presente no sangue em baixas concentrações, sendo detetada na membrana de basófilos e mastócitos. Os pacientes com doenças alérgicas possuem elevados níveis de IgE; de referir que a interação específica entre o antígeno e a IgE ligada ao mastócito irá resultar na ativação celular com libertação de histamina, leucotrienos, proteases e citocinas. Isto pode resultar no aumento da permeabilidade vascular, na contração do músculo liso e vasodilatação (Ribatti, 2016). Esta classe de imunoglobulinas é responsável por eventos anafiláticos em diversas espécies, especialmente no ser humano.

1.3. Reatividade Cruzada

A reatividade cruzada consiste no reconhecimento de vários antígenos por parte de um anticorpo de especificidade única, isto é, a possibilidade de um anticorpo produzido em consequência da exposição a um antígeno particular poder ligar-se a moléculas estruturalmente relacionadas com esse antígeno (Cases et al., 2014).

A reatividade cruzada da IgE é determinada em grande parte por semelhanças estruturais primárias e terciárias entre as proteínas. De referir que as proteínas que compartilham menos de 50% de identidade de sequência raramente possuem reatividade cruzada (Bublin et al., 2013). A reatividade cruzada da resposta imunitária adaptada não existe apenas ao nível dos anticorpos, mas também nas células T. A reatividade cruzada é útil na medida em que oferece ao sistema imunitário a capacidade de resposta rápida a patógenos relacionados com infeções (Ree et al., 2016).

A reatividade cruzada de anticorpos IgE é conhecida por desempenhar um papel importante nas alergias a pólenes e na alergia alimentar (Cases et al., 2014). É frequente ocorrer reatividade cruzada entre alérgenos de diferentes famílias de plantas, os quais são reconhecidos pelas IgE dos pacientes, apesar dos mesmo não possuírem sensibilização à espécie em questão. Um exemplo é a síndrome de para-vidoeiro, em que os pacientes com rinoconjuntivite provocada pelo pólen de bétula, que sejam asmáticos, apresentam também alergia alimentar a diversos frutos, nomeadamente a maçãs, peras, cerejas e pêsegos (Cases et al., 2014). Outros alérgenos de pólen são já reconhecidos como pan-alérgenos, por ser altamente frequente a sua identificação cruzada, e é o caso da proteína profilina e polcalcina, o que é devido à grande homologia estrutural destas proteínas entre famílias polínicas (Batanero, Villalba, Monsalve, & Rodriguez, 1996). A elevada conservação das sequências de aminoácidos e a ampla homologia na estrutura terciária entre profilinas das diferentes espécies é responsável pela reatividade cruzada desta família de proteínas (Landa-pineda, Guidos-fogelbach, Marchat-marchau, Arroyo-becerra, & Reyes-lópez, 2013)

A reatividade cruzada pode ser confirmada através do estudo da especificidade da deteção, obtendo assim mais informações sobre as proteínas envolvidas na mesma (Assarehzadegan, Sankian, Jabbari, Noorbakhsh, & Varasteh, 2009). Através destes estudos foi reconhecida a reatividade cruzada entre vários alergénios de *Salsola kali* com *Chenopodium album*, *Amatanthus retroflexus*, *Kochia scoparia* e *Artemisia douglasiana* (Assarehzadegan et al., 2009). A oliveira e o alfeneiro, pertencentes à família *Oleaceae*, revelam também um perfil semelhante de ligação de IgE a proteínas por imunomarcação, sendo desta forma a reatividade cruzada entre as mesmas justificada pela semelhança ou homologia sequencial entre os seus alergénios principais (Batanero et al., 1996).

1.4. Alergia ao pólen

A alergia é uma resposta “exagerada” por parte do organismo após o contato com agentes estranhos ao corpo humano. Esta é causada por reações de hipersensibilidade do sistema imunitário a agentes que causam problemas de diversas formas (Nowak & Schaub, 2019).

A alergia é um problema de saúde global, de impacto socioeconómico substancial em termos de custos directos (custos de sistema social, medicação, tratamento e hospitais) e indirectos (dias de folga dos postos de trabalho, redução de produtividade, entre outros), para além de afetar a saúde da população (Mckee & Alto, 1966). As taxas de incidência e o impacto das alergias variam, assim como as respostas de saúde pública à alergia (Nowak & Schaub, 2019).

A alergia ao pólen é uma das principais causas de problemas de saúde a nível respiratório, na atualidade. Um dos problemas que esta desencadeia é a rinoconjuntivite alérgica (AR), que afeta cada vez mais crianças, assim como jovens adultos, em particular na segunda e quarta década de vida (Bastl, Berger, Kmenta, & Weber, 2017). A alergia ao pólen também está associada à asma, sinusite, apneia do sono e problemas de saúde mental. A alergia respiratória leva a uma diminuição significativa da qualidade de vida, assim como do bem estar.

As fontes de alergénios polínicos clinicamente mais relevantes incluem as gramíneas, árvores e ervas daninhas (Bastl et al., 2017). De referir que algumas famílias

de proteínas são compartilhadas por estas fontes de pólen. A exposição aos agentes polínicos é a base da resposta alérgica. Após a exposição, pode ocorrer uma reação alérgica, que afeta as vias aéreas superiores (cavidade nasal, cavidade oral, laringe e faringe), e por sua vez, as vias aéreas inferiores (traqueia, pulmões, brônquios, bronquíolos e alvéolos pulmonares) (Va et al., 1953). Assim, evitar a exposição desempenha um papel fundamental na saúde respiratória de quem sofre de alergias (Bastl et al., 2017), sendo este um cuidado importante a ter por parte dos pacientes e que podem ser incentivados pelos serviços de saúde. Informações sobre o nível de risco e os períodos de exposição ao pólen (calendários de polinização das diferentes espécies), podem ser utilizados como ferramenta por parte dos alérgicos e dos profissionais de saúde de forma a ajustar o comportamento e, por sua vez, reduzir a exposição e a diminuir ou amenizar o aparecimento de sintomas. O conhecimento das tendências da exposição sazonal ao pólen, ajuda na educação sobre os benefícios de tratamentos clínicos, assim como no planeamento de serviços de saúde pública adequados às diferentes épocas (Tiotiu et al., 2016).

1.5. O pólen: Características morfológicas e estruturais

O pólen é uma estrutura biológica produzida pelo órgão masculino (antera) de plantas com flor (Figura 2). Macroscopicamente, o pólen é um pó fino, que consiste em milhares de grãos de pólen, com aproximadamente entre 10 a 150 μm de diâmetro (Davies, Grove, Hospital, & Service, 2019).



Figura 2 - Micrografia, obtida por microscopia eletrônica, de partícula de pólen.

A função biológica do pólen é conter o material genético da planta dentro do gameta masculino, até este ser transferido ao órgão recetor feminino (estigma) (Davies et al., 2019). O pólen pode ser transportado por insetos, sendo este denominado por entomófilo, e por outro lado, temos o pólen transportado pelo vento, conhecido como anemófilo (possui entre 10 a 50 μm e superfícies aerodinâmicas com baixa densidade) (Amato et al., 2007). Os fatores climáticos influenciam o transporte do pólen anemófilo, sendo estes a temperatura, humidade e velocidade do vento (Moreno et al., 2018).

É de referir que normalmente o pólen anemófilo é o que causa alergias. O pólen alergénico tende a ser derivado de inflorescências, visualmente pouco atraentes, como flores de gramíneas e amentilhos de árvores, e de algumas ervas daninhas (Davies et al., 2019). A libertação dos pólenes das anteras, vai depender da dispersão do vento, o que requer força física, de forma a mover as partes da flor (Moreno et al., 2018).

O pólen possui uma camada externa que pode ser composta por várias subcamadas, exina e intina onde se podem encontrar poros ou fendas (Figura 3) e contém um núcleo reprodutivo, o qual se encontra presente no citoplasma, assim como o núcleo vegetativo.

Os grãos de pólen contêm alergénios dentro das componentes internas e externas da estrutura. Apesar de possuir vários tipos existentes, apenas entre 5 a 20 famílias de proteínas extraídas do pólen possuem propriedades alergénicas (Davies et al., 2019). O conhecimento das propriedades bioquímicas e imunológicas dos componentes alergénicos, as isoformas e respetivas variantes, são relevantes para entender as propriedades dos mesmos, sendo que o sistema imunológico de um indivíduo pode distinguir as diferentes isoformas alergénicas e proteínas da mesma família bioquímica, que não possuem carácter alérgico. As propriedades bioquímicas são determinadas com recurso a técnicas de laboratório como a eletroforese, espectrometria de massa e análise proteica (Celenk, 2019).

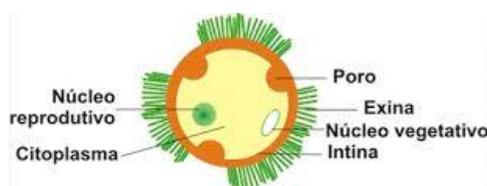


Figura 3 - Esquema representando as estruturas num grão de pólen.

Os genes que codificam proteínas com semelhanças a alergénios que não apresentam características como tal, podem fornecer informações sobre a estrutura e funções dos alergénios e revelar as moléculas hipoalergénicas com potencial terapêutico (Davies et al., 2019). A variação de sequências de aminoácidos e na estrutura de superficial dos alergénios, afetam a especificidade da sensibilização do paciente e o seu potencial alergénico (Moreno et al., 2018).

1.5.1. Tipos polínicos presentes na Península Ibérica

As plantas alergizantes pertencem basicamente a 3 grupos: árvores com polinização dominante no final do Inverno e início da Primavera das quais se destacam as famílias da *Cupressaceae*, *Corylaceae*, *Oleaceae*, *Pinaceae*, *Platanaceae*, *Fagaceae* e *Betulaceae*; ervas que incluem as diferentes espécies de *Gramineae* que polinizam predominantemente na Primavera e início do Verão; plantas silvestres ou chamadas ervas daninhas e arbustos com polinização, que se inicia na Primavera, estende-se por todo o Verão e início do Outono e que incluem famílias como as *Urticaceae*, *Compositae*, *Chenopodeaceae* e *Plantaginaceae* (Todo-bom, Nunes, & Caeiro, 2004).

Os principais responsáveis pela polinose em Portugal e Espanha são as gramíneas, sendo uma constante em todos os países do Mediterrâneo (também Itália e França) e entre as árvores, são de referir a oliveira e o plátano cuja abundância contribui para o agravamento do problema (Todo-bom et al., 2004).

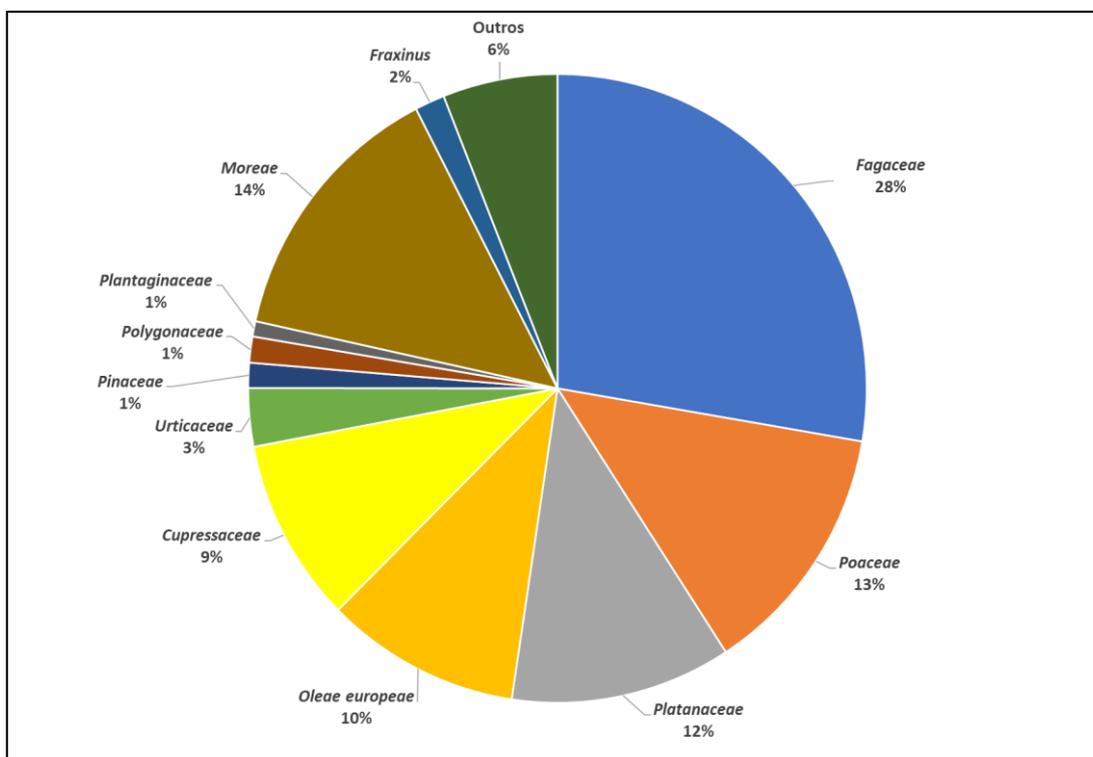


Figura 4 - Espectro polínico na região de Évora (PolenAlert – [1] <https://lince.di.uevora.pt/polen/index.jsp>). Dados obtidos na estação polínica PTEVOR, instalada na plataforma de observações atmosféricas do ICT, Évora.

Em Évora, por exemplo, nos meses de Inverno, em Janeiro e Fevereiro, observam-se contagens muito altas de *Cupressaceae* e de *Urtica*; a partir de Março, durante toda a Primavera, observam-se contagens elevadas de *Pinus*, *Quercus*, *Parietaria*, *Poacea*, *Olea*, *Platanus Rumex*, *Plantago* e *Compositae* ([1]; Todo-bom et al., 2004). Na figura 4 são apresentados valores captados dos diferentes alergénios presentes na zona atmosférica de Évora.

1.5.1.1. *Salsola kali*

A *Salsola kali* (Figura 5) cujos nomes mais frequentes em Portugal são barrilheira ou barrilheira-espinhosa é uma planta que pode ser encontrada na orla costeira portuguesa e espanhola, bem como em outras regiões de clima temperado de solos com elevado conteúdo salino, nomeadamente no interior da Península Ibérica, nas orlas costeiras de países europeus, no Norte de África, países do Médio Oriente e na parte central e costa ocidental dos Estados Unidos (Castro et al., 2014).



Figura 5 - Fotografia de uma planta *S. kali* (obtido em [2]).

A *S. kali* é um arbusto de tamanho variável, esférico, que após o florescimento adquire uma cor acastanhada. No final do verão, o caule seca, fazendo com que a planta fique ao nível do solo, tornando-se assim uma planta “rolante”, a qual sofre transporte por ação do vento, o que auxilia na dispersão da semente (Tehrani et al., 2010). Em Portugal, esta espécie está presente maioritariamente no Algarve, em algumas zonas da Costa Vicentina, Vale do Sado, Lisboa e em praias na zona da Nazaré (Pereira et al., 2006).

A *S. kali* pertence à família *Amaranthaceae*. O pólen desta espécie é disseminado de forma anemófila entre os meses de Junho e Outubro, com maior incidência nos meses de Agosto e Setembro, sendo uma das maiores causas de doenças respiratórias em países semiáridos. Do ponto de vista alergológico, em países áridos como o Irão, Emiratos Árabes Unidos e Kuwait, o pólen de *S. kali* afecta em média 42% das pessoas que sofrem de alergia, apesar de representar apenas cerca de 5% do pólen total (Castro et al., 2014). Em Espanha, as regiões mais afetadas são as regiões de Toledo, Zaragoza e Ciudad Real (com 68,35 e 51% de sensibilização, respetivamente). A sensibilização média em Portugal foi estimada em 13% num estudo de 2006 realizado em doentes com rinite alérgica de várias zonas do país (Pereira et al., 2006).

Os alergénios de *S. kali* já referidos na literatura são o Sal k 1, Sal k 2, Sal k 3, Sal k 4, Sal k 5, Sal k 6 e Sal k 7 (Tabela 2). O alergénio Sal k 1 é considerado o alergénio *major*, é uma metilesterase, uma glicoproteína de 40 kDa, com elevado polimorfismo e possuindo um ponto isoelétrico compreendido entre 6,3 e 8,8 (Tehrani et al., 2010). O Sal k 2 e o Sal k 3 são também enzimas, o primeiro é uma proteína cinase e o segundo é uma metionina sintase, com massas molares de 36 e 39-45 kDa, respetivamente (Assarehzedegan et al., 2010). O Sal k 4 é uma profilina, de massa molar 14,4 kDa (Arilla et al., 2010).

Tabela 2 - Alergénios identificados em pólen de *S. kali*.

Alergénio	Proteína Identificada / Função	MM	PI
Sal k 1	Metilesterase	40 kDa	6,3-8,8
Sal k 2	Cinase / Homólogos da proteína cinase	36 kDa	
Sal k 3	Metionina sintase	39-45 kDa	
Sal k 4	Profilina / Proteínas de ligação à actina	14,4 kDa	
Sal k 5	Inibidores da tripsina / Ole e 1-like	18,2 kDa	
Sal k 6	Poligalacturonase (não clivada) Poligalacturonase (clivada)	47 kDa 28 kDa	
Sal k 7	Polcalcina / Proteínas de ligação ao cálcio	8,5 kDa	

1.5.1.2. *Olea europaea*

A oliveira (*Olea europaea*) é uma árvore bastante disseminada a nível mundial, originária da área a sul do Cáucaso. O cultivo da mesma teve início no Chipre, seguindo-se o Egito, acabando por ocupar todos os países da bacia do Mediterrâneo (Marazuela et al., 2012). O pólen *Olea* é actualmente uma das maiores fontes de alergia, sendo que a sua sensibilização está documentada em regiões onde a árvore é cultivada (Marazuela et al., 2012). A polinose tem aumentado como resultado de modificação nas práticas agrícolas. A *Olea europaea pollinosis* é clinicamente caracterizada por sintomas de rinoconjuntivite e asma brônquica (Amato et al., 2007). A altura de polinização desta espécie é de Maio a Junho [1].



Figura 6 - Fotografia de uma árvore *Olea europaea* (obtido de [2]).

Actualmente, 13 alergénios foram descritos na *O.europaea*, 12 de pólen e um alergénio alimentar da azeitona, a taumatina (Cases et al., 2014). A Ole e 1 é o principal alergénio, sendo este reconhecido por mais de 70% dos indivíduos sensibilizados à Oliveira, tendo sido proposto como marcador e diagnóstico para sensibilização primária à *Oleaceae*. Este é considerado o alergénio major da Oliveira (Cases et al., 2014). A Alergia ao pólen de Oliveira é causada na maioria dos casos por ação do Ole e 1, mas outros alergénios, polcalcina (Ole e 3 e Ole e 8), Ole e 4, Ole e 9 e a proteína de transferência de Lípidos (Ole e 7), também podem estar associados (Scala et al., 2014). Na tabela 3 são apresentados os diferentes alergénios assim como as diferentes características dos mesmos.

O alergénio Ole e 1, um inibidor da tripsina, possui uma massa molecular de aproximadamente 20 kDa na sua forma glicosilada, enquanto que na forma não

glicosilada tem uma massa molecular de 16 kDa, e uma prevalência de ligação à IgE superior a 80%. Trata-se de uma proteína acídica com um ponto isoelétrico de 5,5, 5,9 e/ou 6,6. O Ole e 1 possui 145 aminoácidos, existindo em 2 formas, a glicosídea (80 a 85% de alergénio total) e a não glicosídea, a qual possui um local de glicosilação localizado no resíduo de asparagina (Asn-111) da cadeia polipeptídica (Boluda, Casanovas, & Fernandez-caldas, 1999). Após a síntese do alergénio Ole e 1, a proteína é maturada no retículo endoplasmático e destina-se a ser segregada. Parece estar envolvida no reconhecimento entre o pólen e o estigma e na formação do tubo polínico, uma vez que é sintetizada na última fase de maturação do pólen e sofre uma regulação durante a formação do tubo polínico (Alché, Mohamed, Castro, & Rodríguez-garcía, 2004). Apresenta três ligações dissulfureto, entre os resíduos 19-90, 22-131 e 43-78. No resíduo asparagina-111 podem ocorrer N-glicosilações, em particular por glicanos complexos, que podem contribuir para a antigenicidade. Existem várias variantes desta proteína devido a polimorfismos que ocorrem entre as muitas variantes de Oliveira.

O Ole e 2 tem um peso molecular de 15 kDa, sendo esta uma profilina com um ponto isoelétrico igual a 5,1. Esta possui uma ligação à actina, que se encontra no citoplasma celular, tendo como função regular a polimerização da actina no citoesqueleto e também regular a permeabilidade da membrana celular (Landa-pineda et al., 2013). O Ole e 3 é uma proteína de ligação, com uma massa molecular de 9,5 kDa que apresenta homologia com alergénios da espécie, sendo esta proteína uma polcalcina, com um ponto isoelétrico igual 4,2 e/ou 4,3. O Ole e 4 é um alergénio com 32 kDa, de função desconhecida, sendo esta uma superóxido dismutase (proteína). O Ole e 5 é um alergénio menor de 16 kDa com elevado grau de homologia com as superóxido dismutase, possuindo 5 isoformas (Boluda, Casanovas, & Fernandez-Caldas, 1999).

Tabela 3 - Alergénios identificados em pólen de *O. europaea*.

Alergénio	MM	PI	Proteína Identificada / Função
Ole e 1 (glicosilada) Ole e 1 (não-glicosilada)	20 kDa 16 kDa	5,5; 5,9; 6,6	Proteína acídica
Ole e 2	15 kDa	5,1	Profilina
Ole e 3	9,5 kDa	4,2; 4,3	Polcalcina
Ole e 4	32 kDa	4,6; 5,1	Superoxidodismutase (SOD)
Ole e 5	16 kDa	5,1; 6,5	desconhecida - 5 isoformas
Ole e 6	10 kDa	4,2	
Ole e 7	9,8 e 10,3 kDa	> 9	Proteína de transporte de lípidos (LTP)
Ole e 8	21 kDa	4,5	
Ole e 9	45 kDa	4,8; 4,9; 5,1; 5,4	1,3-β-glucanase
Ole e 10	10,8 kDa	5,8	Liga-se à laminarina
Ole e 11	39,65 kDa	6,3-6,9	Pectina metilesterase
Ole e 12	-----	4,8-5,7	Isoflavina redutase
Ole e 13	23 kDa	4,3; 4,8	Taumatinas

1.6. Métodos utilizados no estudo dos perfis proteicos e de alergénios dos pólenes

As técnicas mais comuns para a separação de proteínas são a eletroforese unidimensional (1D) e a eletroforese bidimensional (2D), normalmente em gel de poliacrilamida (PAGE) (Drabik, Bodzo, & Silberring, 2016).

Dentro das técnicas eletroforéticas unidimensionais, as mais utilizadas são a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e a Focagem isoelétrica (IEF).

1.6.1. A técnica de eletroforese em SDS-PAGE

A SDS-PAGE é realizada em condições de desnaturação, utilizando calor e na presença de dodecilsulfato e sódio (SDS) e outros agentes redutores, como o β -mercaptoetanol ou o di-tiotreitol de forma a quebrar as ligações persulfureto (Drabik et al., 2016).

A dimensão dos poros presente no gel irá depender das quantidades de acrilamida e bis acrilamida (quanto menor quantidade de acrilamida, maior o tamanho do poro, e por outro lado quanto maior for a quantidade de bis acrilamida, menor a dimensão do poro) (Drabik et al., 2016). De referir que este tamanho do poro, vai permitir definir a separação da proteína, ou seja, poros de maior dimensão permitem uma separação de proteínas de maior peso molecular, enquanto que poros de menor dimensão apenas toleram a separação de proteínas de baixo peso molecular.

O duodecil sulfato de sódio liga-se às proteínas com base no seu tamanho molecular, desta forma as biomoléculas presentes com várias massas e com igual densidade de carga na superfície podem mover-se ao longo do campo elétrico, através do rompimento das ligações não-covalentes das proteínas, provocando assim a respetiva desnaturação, ou seja, uma alteração estrutural, de modo a provocar a separação através do gel de poliacrilamida (Wirth, 2000). Nesta técnica, as proteínas são separadas segundo a sua massa molecular.

1.6.2. A eletroforese 2D

O desenvolvimento da eletroforese bidimensional começou na década de 1960, com a descrição da (IEF). Na década de 1970, *O'Farrell* através dos conhecimentos anteriores fornecidos relatou a criação de mapas 2D, através da combinação ortogonal de uma primeira dimensão com base no fracionamento de carga pura e uma segunda dimensão com base no tamanho e discriminação de cadeias polipeptídicas desnaturadas e dissociadas (“Two-dimensional gel electrophoresis of proteins,”, 2011).

O passo fundamental para o desenvolvimento desta técnica foi a introdução da espectrometria de massa, a qual permite sequenciar pequenos peptídeos e identificar proteínas (Bernhardt, 2018). A separação por eletroforese bidimensional é baseada na migração proteica, a qual é causada pela aplicação de corrente elétrica no gel de poliacrilamida (“Two-dimensional gel electrophoresis of proteins,”, 2011). Neste processo, as proteínas com elevado peso molecular, não têm capacidade para migrar através do gel por longas distâncias, permanecendo assim na extremidade do cátodo do gel (Bernhardt, 2018). As proteínas com menor massa molecular, têm tendência a migrar mais facilmente através dos poros, de forma a migrar em direção ao ânodo do gel. A desnaturação ocorre com a redução e alquilação de ligações dissulfureto, ocorrendo esta após a separação das proteínas (“Two-dimensional gel electrophoresis of proteins,”, 2011). As ligações de hidrogénio são rompidas, assim como as interações hidrofóbicas são bloqueadas de forma a garantir o desdobramento da proteína, através da aplicação de duodecil sulfato de sódio. Este composto possui uma carga negativa, sendo que quando adicionado a sua cadeia hidrofóbica interage com aminoácidos não polares, o que vai fornecer à proteína uma carga negativa (Bernhardt, 2018).

Esta técnica tem diversas vantagens, nomeadamente a sua capacidade de visualizar várias proteínas presentes numa única amostra. Obter um elevado número de informações, uma vez que é possível determinar de forma aproximada a sua massa molecular e o ponto isoelétrico (Drabik et al., 2016). Permite ainda realizar medições quantitativas da expressão proteica, dada a corrida do gel e a respetiva análise da imagem com o software adequado. As proteínas hidrofóbicas, uma vez que são insolúveis em soluções de extração proteica, são um desafio relativamente à sua análise (Bernhardt,

2018). No entanto, na grande maioria das aplicações a 2D, fornece resolução e é especialmente adequada para a análise simultânea de múltiplas amostras de proteínas num único gel.

Nos presentes dias, a técnica é aplicada em questões de Controlo de Qualidade, a nível da indústria Farmacêutica e da Biotecnologia, na análise da pureza de proteínas recombinantes, assim como para a análise de alérgenos, ou seja, a constituição dos mesmos nomeadamente as suas proteínas. Isto deve-se à sua capacidade em revelar uma grande variedade de modificações pós-traducionais, assim como contaminações (proteínas indesejadas), alterações de carga e modificações ou até mesmo mutações (Bernhardt, 2018).

1.6.3. As técnicas de *immunoblotting*

O *Immunoblotting* ou *Western Blotting* é uma técnica de laboratório, na qual são utilizados anticorpos para identificar proteínas que foram transferidas para a membrana. Requer, normalmente, a separação de proteínas de acordo com a sua massa molecular por eletroforese SDS-PAGE (Gwozdz & Dorey, 2017), ou por outra técnica como a IEF. Pode, contudo, ocorrer em amostras sem separação, em que as amostras são aplicadas diretamente na membrana (DOT-BLOT).

Trata-se de uma técnica bastante eficaz para a deteção de uma proteína de interesse numa mistura, para identificar mudanças na concentração de proteínas nas diferentes amostras, identificar modificações pós-traducionais, como fosforilações e para caracterizar complexos proteicos (Wehr & Levine, 2012).

O *Western blot* não é uma técnica quantitativa, pois não informa sobre a quantidade de proteína na amostra. Contudo pode ter aplicações semi-quantitativas, permitindo avaliar diferenças nos níveis de expressão.

Devido a ser uma técnica com diversos passos, esta pode estar sujeita a pequenas imprecisões (como transferência irregular), que podem resultar em diferenças entre

repetições (Wehr & Levine, 2012). Assim, de forma a aumentar a precisão da análise, as condições devem de ser firmemente estabelecidas e, em particular, na otimização da técnica devem ser testadas múltiplas diluições dos anticorpos.

É um método bastante sensível. Contudo, se a proteína de interesse estiver em baixa concentração, pode não ser detetada (Gwozdz & Dorey, 2017). O método irá ser tão específico quanto mais específico for o anticorpo a ser utilizado na marcação da membrana (se a especificidade do anticorpo é fraca, o resultado não irá ter uma fácil interpretação e, neste caso, deverá ser utilizado um novo anticorpo).

Como referido, trata-se de uma técnica extensa, a qual deve ser sujeita a várias considerações durante a realização da mesma. A preparação da amostra, requer a lise das células, sendo que dependendo das estruturas celulares (núcleo, citoplasma, membrana plasmática) e tipo de célula (mamíferos, bactérias, leveduras entre outros), vai necessitar da utilização de um tampão, o que na maioria dos casos é um tampão Tris-HCL.

Quando separadas por PAGE, as proteínas têm de ser transferidas do gel para uma membrana, por transferência eletroforética. Neste processo é preparada uma “sandwich”, na qual uma membrana está em contacto com o gel e é prensada entre papel de filtro e fibra, num tampão de transferência. Existem 2 tipos principais de membrana, nitrocelulose e PVDF (difluoreto de polivinilideno). A nitrocelulose é carregada e liga as proteínas através da sua parte hidrofílica, de forma rápida e eficiente. As membranas de PVDF não estão carregadas, sendo que se ligam a partes hidrofóbicas das proteínas, e requer uma ativação com metanol (Gwozdz & Dorey, 2017).

A transferência pode ocorrer em meio húmido ou semi-seco. Na transferência húmida, o contacto entre o gel e a membrana durante a transferência é assegurada por um suporte sólido, sendo a “sandwich” totalmente submersa no tampão de transferência (Gwozdz & Dorey, 2017). Desta forma, é possível realizar transferências de uma gama mais ampla de proteínas, sendo favorável para grandes proteínas (> 100 kDa). Tem como desvantagem levar mais tempo e maior quantidade de tampão de transferência (Gwozdz & Dorey, 2017). Na transferência semi-seca assim como na húmida, a “sandwich” é colocada entre os elétrodos. É mais rápida, sendo possível processar várias membranas

em simultâneo, em contrapartida tem baixa capacidade de tamponamento, é menos eficaz e pode resultar em dificuldades na deteção de proteínas de elevado peso molecular (Wehr & Levine, 2012).

Por fim, a deteção é realizada com recurso a anticorpos os quais se encontram conjugados com enzimas.

2. Problemática e Objetivos

A alergia resulta de uma resposta imunológica do organismo, causada por reações de hipersensibilidade do sistema imunitário do tipo I (atividade anormal da IgE contra antigénios não patogénicos). Constitui um dos maiores problemas de saúde global, com impacto a nível socioeconómico, perda da qualidade de vida e do bem-estar da população.

As plantas *S. kali* e a *O. europaea*, foram alvo de estudo neste trabalho, a primeira pertence à família *Amaranthaceae*, estando presente principalmente em países áridos e semiáridos, enquanto que a *O. europaea* pertence à família *Oleaceae* estando presente maioritariamente nos países da orla mediterrânea, sendo uma espécie de elevada importância económica em diversos países. Nestes países, a *S. kali* é, a par da *O. europaea*, uma das causas de alergia sazonal, tendo sido descrita a possibilidade de haver reatividade cruzada entre as espécies mencionadas atribuída a diversos alérgenos, nomeadamente nas famílias Sal k 4 (Ole e 1-like) e Ole e 1 (Castro et al., 2014). De fato, tem-se observado que indivíduos cujos testes cutâneos revelam sensibilidade apenas a uma das espécies apresentam sintomas fora da época de polinização dessa espécie (Abril e Junho, Junho e Outubro, respetivamente), o que sugere a hipótese de ocorrer reatividade cruzada entre alguns dos alérgenos.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a hipótese de ocorrência de reatividade cruzada entre os alérgenos de *S. kali* e *O. europaea*, assim como a identificação de alguns desses alérgenos.

Assim, os objetivos deste trabalho foram:

- ✓ Identificação e caracterização dos alérgenos *Ole e 1*, *Ole e 1-like*, profilina e polcalcina em extratos polínicos de *S. kali* e *O. europaea*;
- ✓ Caracterização de alergogramas de indivíduos com sensibilização a *S. kali* e/ou *O. europaea*;
- ✓ Análise de reconhecimento cruzado de alérgenos de *S. kali* e *O. europaea*;

3. Metodologia

3.1. Material, equipamento e reagentes

A lista de material/equipamento e reagentes irá ser apresentada no Anexo I.

3.2. Caracterização da população em estudo

Para este estudo foram selecionados doze indivíduos, acompanhados na consulta de alergologia do Hospital General La Mancha Centro, de Alcázar de San Juan. Todos estes indivíduos foram diagnosticados com polinose apresentando sintomas na Primavera e final do Verão. Foram avaliados por teste *Prick* para confirmação da sensibilização (Ver Anexo II). Com base nestes testes foram selecionados indivíduos sensibilizados a pólen de *S. kali* e/ou *O. europaea* e foram constituídos 3 grupos (ver tabela 4): IgE O⁻ S⁺ - Grupo dos indivíduos que apresentam IgE específica para *S. kali*; IgE O⁺ S⁻ - Grupo de indivíduos que apresentam IgE específica para *O. europaea*; IgE O⁺ S⁺ - Grupos de indivíduos que apresentam IgE específica para *S. kali* e *O. europaea*. Para todos os indivíduos foi também determinada a IgE total e algumas IgE específicas do soro cujos resultados se apresentam na tabela 4.

Tabela 4 - Níveis de IgE total e de IgE específicas serológica dos indivíduos alérgicos envolvidos neste estudo.

Grupo	IgE Total (UI/mL)	IgE Olea (U/mL)	IgE Ole e 1 (U/L)	IgE Salsola (U/mL)	IgE Sal k 1 (U/mL)
4	6,7	0,12	0,09	1,68	4,56
6	35,3	0,43	0	4,98	5,97
7	45,9	0,01	0	7,47	23,9
8	65,4	0,01	0	0,52	--
11	48,7	2,69	4,38	0	--
12	216,9	0,96	0,59	0,04	0
14	34,5	0,69	0,89	--	--
16	351	13,6	11,8	0,24	--
1	37,8	2,17	1,8	5,19	--
2	293	6,15	5,87	18,8	34,3
3	25,2	5,29	6,07	2,49	--
5	108,2	1,47	1,07	4,27	--

3.3. Preparação dos Extratos

Para se efetuar a preparação dos extratos começou-se por pesar 100 mg de cada tipo polínico (*O. europaea* ou *S. kali*) aos quais foram adicionados 10 mL de solução tampão de extração (composição, 0,1 mM: NaHCO_3 ; pH= 8.0) e 15 microlitros de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PSFH) 10 M em isopropanol (este reagente tem como função inibir proteases). As soluções foram a agitar durante um período de 2 horas, onde os tubos foram isolados da luz solar. Este procedimento de agitação na ausência de luz solar foi repetido 2 vezes de forma a extrair maior quantidade de proteína. Seguiu-se uma centrifugação a 3000 g durante 10 minutos, sendo em seguida o sobrenadante guardado. O sedimento foi novamente extraído seguindo procedimento equivalente, juntando-se os sobrenadantes, que foram aliquotados e armazenados a -20°C . Estes sobrenadantes daqui em diante irão ser referenciados como extrato polínico proteico (EPP).

3.4. Quantificação do conteúdo proteico total pelo método do ácido bicinconínico (BCA)

O conteúdo em proteína foi quantificado com recurso ao método do ácido bicinconínico (BCA), neste é dada uma redução na qual o Cu^{2+} passa a Cu^{1+} por ação de uma proteína em meio alcalino (reação do biureto), com a respetiva deteção colorimétrica, a qual é bastante sensível e seletiva do catião cuproso, através da utilização de um reagente que contem ácido bicinconínico. O produto da reação de cor púrpura deste ensaio é formado pela quelação de duas moléculas de BCA com um ião cuproso, de referir que este complexo, solúvel em água, apresenta uma forte absorvância a 562 nanómetros, que é diretamente proporcional ao aumento das concentrações de proteínas numa gama compreendida entre 20 e 2000 $\mu\text{g/mL}$.

A estrutura macromolecular da proteína analisada, o número de ligações peptídicas e a presença de quatro aminoácidos específicos (cisteína, cistina, triptofano e tirosina), são relatados como responsáveis pela formação da cor com o BCA. Estudos com di-, tri- e tetra-peptídios sugerem que a extensão da formação de cores é causada por mais do que uma junção de grupos funcionais individuais de produção de cores. A concentração de proteína é determinada com referência aos padrões de uma proteína comum, como a

albumina de soro bovino (BCA). Uma série de soluções de concentração conhecida são preparadas a partir da proteína e analisadas a par das amostras de concentração desconhecida, as quais irão ser determinadas com base numa curva padrão.

Nesta fase foi preparada uma microplaca de 96 poços, em que cada poço continha um volume de amostra de proteína (10-25 μL) e 100 μL de reagente (Micro BCATM *Protein Assay Kit*, *Thermo Scientific*). Começou por se preparar um conjunto de soluções padrão aquosas de albumina de soro bovina (BSA) de concentração 7, 15, 31, 62, 125, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida foi preparado o reagente de trabalho, tendo sido preparados 100mL. Usou-se água para o branco.

Depois foram feitas diluições de 40, 20 e 10 vezes das amostras EPP de *O. europaea* e *S. kali*. Foram pipetados 10 μL de branco, padrões e amostras, em triplicado, e 200 μL de reagente BCA e em seguida a placa colocada a incubar sob agitação suave durante 30 minutos. Por fim a absorvância foi lida a 562 nanómetros no espectrofotómetro com leitor de microplacas.

Foi preparada uma curva padrão onde os valores de absorvância das amostras foram interpolados de forma a se determinar a concentração em mg/mL de proteína presente para cada uma das amostras.

3.5. Western blot para identificação dos alérgenos

A identificação e caracterização dos alérgenos Ole e 1, profilina e polcalcina foi realizada por *Western-blot*. Para isso, foi necessário fazer a separação das proteínas dos EPP que, neste caso, ocorreu por SDS-PAGE, seguindo-se a eletrotransferência das proteínas do gel para uma membrana e, por último a imuno-marcação das proteínas de interesse com anticorpos adequados e a sua análise.

3.5.1. SDS-PAGE dos extratos polínicos

Em primeira instância foi preparado o sistema de SDS-PAGE, no qual os vidros foram montados, juntamente com o restante material eletroforético (sempre com o cuidado de limpar o mesmo com recurso a etanol, de forma a evitar contaminações que prejudiquem a polimerização). Foi preparado o gel de resolução e o gel de concentração. O gel de resolução (12%) foi preparado com 2,5 mL de Tris-HCL 1,5 M, 100 µL de SDS 10%, 3,4 mL de H₂O, 4 mL de acrilamida/Bis 30 %, 75 µL de APS e 5 µL de TEMED. Após a preparação, este foi aplicado no sistema com recurso a uma micropipeta, sem criar bolhas de ar, sendo adicionada água de forma a evitar o contacto com o ar. Em seguida foi preparado o gel de concentração (4%) com 1 mL de Tris-HCL 0,5 M, 40 µL de SDS 10%, 2,43 mL de H₂O, 0,53 mL de acrilamida/Bis 30%, 24 µL de APS 10% e 4,4 µL de TEMED. Realizada a polimerização do gel de resolução, foi retirada a água e aplicado o gel de concentração, sendo colocado o pente até à respetiva polimerização do mesmo. Quando a mesma se realizou foi retirado o pente e os poços foram lavados com água destilada.

A câmara interna foi montada, sendo esta preenchida com tampão de corrida 1x (preparado a partir da diluição do tampão de corrida 10x: Tris-Base 25 mM, 250 mM, SDS 10 %, pH 8,3), foram aplicados 50 µg de proteína em cada poço (diluída a partir do EPP com água e tampão de amostra 6x (Tris-HCL 1,5 MM, SDS 10%, glicerol 30%, azul bromofenol 0,06%, DTT 600 mM, pH 6,8) e aquecimento a 95°C durante 5 minutos. A tina eletroforética foi ligada a uma fonte de alimentação, aplicando-se as condições de corrida: 140 V, 60 mA e 15 Watt. Depois do azul de bromofenol atingir o fim do gel, desligou-se o sistema da corrente (cerca de 1 hora e 30 minutos a 2 horas após começo).

Terminada a eletroforese e desligado o sistema, a tampa da tina foi retirada sendo descartado o recipiente interno. Removeu-se a cassete do gel e este foi retirado, separando cuidadosamente as 2 placas de vidro.

3.5.2. Eletrotransferência

Para a eletrotransferência, papéis de filtro e membranas de PVDF foram cortadas de acordo com as dimensões do gel (sempre tendo em atenção a utilização de luvas de forma a evitar contaminações), sendo efetuado um pequeno corte nas membranas de forma a identificar as mesmas. As membranas foram ativadas, colocando-as 5 segundos em metanol e 5 minutos em H₂O destilada. Em seguida, tanto o gel como a membrana foram colocados em tampão de transferência (Tris-HCL 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, metanol 20%) durante 20 minutos. De seguida foi preparada a “sandwich” do gel. Começou-se por colocar uma placa de fibra humedecida, em cima desta foi colocada uma folha de papel de filtro e o gel. Para finalizar foi colocada uma membrana humedecida (sempre evitando a formação de bolhas). A distribuição final dos componentes foi de acordo com o esquema apresentado na figura 7.

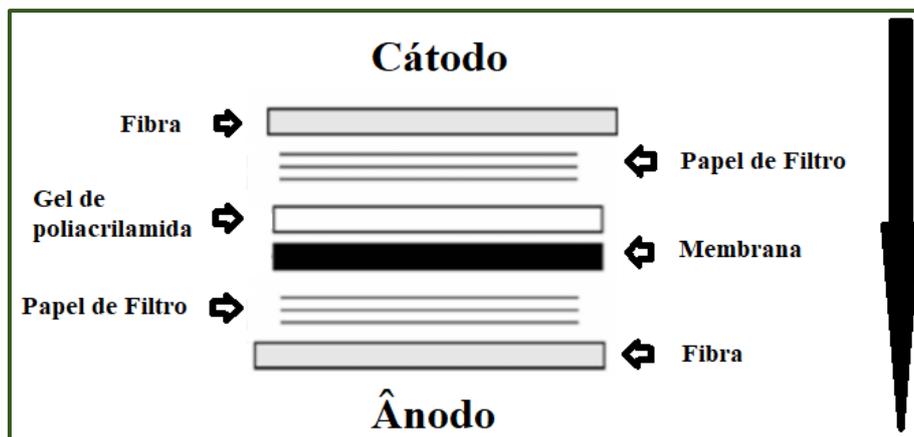


Figura 7 - Estrutura da "Sandwich". Adaptado de (Kurien & Scofield, 2015).

A cassete foi fechada sempre com o cuidado de não se mover a “sandwich” do gel. As cassetes preparadas foram colocadas no módulo, com o lado preto da cassete colocado para o lado preto do sistema. Foram inseridas as unidades de arrefecimento e o

tanque foi preenchido com tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, pH 8.3, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0.037%). Foi adicionado um agitador magnético de forma a que a temperatura do tampão e a respetiva distribuição iónica se mantivessem constantes (a velocidade deverá ser tão rápida quanto possível). A tampa foi colocada e os cabos ligados à fonte de alimentação de forma a iniciar a transferência (condições: 350 mA, 150 V, 40 W, durante 1 hora). Quando terminou a corrida, a sandwich foi aberta e removida a membrana.

3.5.3. Imunodeteção

Durante esta fase do procedimento foi realizada a deteção de diversos alérgenos nas amostras de *O. europaea* e *S. kali*, assim como a obtenção de alergogramas individuais. De referir que as fases de SDS-PAGE e eletrotransferência foram comuns e parte do procedimento anterior à imunomarcção.

3.5.3.1. Deteção do alérgeno Ole e 1 e Ole e 1-like

Numa primeira fase, foi realizada a identificação dos valores de *Ole e 1* e *Ole e 1-like*. A membrana, com a separação dos EPP de *S. kali* e de *O. Europaea* Terminada a eletrotransferência, as membranas foram colocadas em solução de bloqueio com 5 % de leite magro (100 mL TBS-T, 5 g leite em pó) durante 2 horas, à temperatura ambiente, seguindo-se a incubação com anticorpo biotilado¹ Anti-*Ole e 1* (B-04, Bial, diluído 1:5000, preparado adicionando 1 µL de Ab Biotilado a 5 mL TBS-T), “overnight” a 4°C, com agitação. Seguiram-se lavagens com TBS-T, 3 vezes durante 8 minutos cada. A membrana foi, em seguida, incubada com a *Estreptavidina*²-*peroxidase* (5 mL TBS-T

¹ A biotina pode ser conjugada com enzimas, ácidos nucleicos ou anticorpos. O seu reduzido tamanho, permite a ligação às referidas estruturas sem que ocorram perdas das características imunológicas ou físicas. Desta forma é possível “revestir” um anticorpo ou uma enzima com um grande número de moléculas de biotina, que se comportam como locais de ligação para a avidina, de referir que este processo, implica a passagem da biotina para a sua forma ativada permitindo assim a sua ligação através do grupo carboxílico às zonas NH₂ da molécula a ser biotilada.

² A estreptavidina é uma proteína de peso molecular de 60 kDa, extraída da cultura de *Streptomyces avidinii*; embora a avidina possua uma estrutura secundária, terciária e quaternária quase idêntica à da estreptavidina, as duas proteínas mostram apenas 30% de semelhança quando sequenciadas, de referir ainda que a avidina tem uma maior afinidade para a biotina não conjugada enquanto a estreptavidina possui maior afinidade para a biotina conjugada.

para 10 µL de *Streptavidina peroxidase*), durante 2h à temperatura ambiente. A ligação entre o anticorpo biotilado e o enzima conjugado com estreptavidina ocorre pela elevada afinidade entre a biotina e a estreptavidina, formando-se ligações não covalentes, fortes e rápidas.

Após nova série de lavagens com TBS-T, 3 vezes. Foi realizada a revelação das membranas com TMB, sendo este aplicado até ao aparecimento de bandas (ter sempre em atenção a elevada toxicidade do TMP) e colocadas em água de forma a parar a reação. As membranas foram fotografadas para posterior análise.

Este procedimento foi realizado em duplicado.

3.5.3.2. Detecção dos alergénios Profilina e Polcalcina, em *S. kali* e *O. europaea*.

Após a respetiva SDS-PAGE (Ver seção 3.5.1), a eletrotransferência (Ver seção 3.5.2) e bloqueio da membrana, foram preparados os anticorpos Anti-Profilina e Anti-Polcalcina, produzidos em coelho por inoculação de proteínas recombinante de profilina e polcalcina de *S. kali* (cedidos pela firma *Probelte Pharma S.L.U.*), por diluição de 20 µL de anticorpo em 4980 µL de TBS-T. As incubações com os anticorpos decorreram a 4°C, “*overnight*”, com agitação.

Seguiu-se, após lavagens executadas de forma semelhante ao subcapítulo anterior, a incubação com anticorpo secundário, durante 2h à temperatura ambiente, tendo sido utilizado um anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (NIF1317, GE *Healthcare*). Procedeu-se nova série de lavagens e por fim a revelação, neste caso com um substrato da fosfatase alcalina (RPN5785, GE *Healthcare*) que origina um produto fluorescente. Neste caso, as membranas foram analisadas com recurso ao equipamento de captação de imagem Gel-Doc (Bio-RAD), sob radiação UV.

Este procedimento, para cada um dos alergénios, foi realizado em duplicado.

3.5.3.3. Detecção de proteínas dos EPP reconhecidas por pools de soros

Neste ponto do procedimento, a parte inicial da criação dos géis para a SDS-PAGE (Ver seção 3.5.1) assim como a eletrotransferência (Ver seção 3.5.2) foram iguais aos pontos anteriores do procedimento, sendo a imuno-marcação diferente. Serão descritos com maior pormenor os aspetos em que esta imuno-marcação difere das anteriormente descritas.

Após realizada a transferência, as membranas foram bloqueadas. Fez-se então a preparação dos soros para cada um dos grupos de indivíduos (IgE O⁻S⁺, IgE O⁺ S⁻ e IgE O⁺ S⁺), sendo estes constituídos por 250 µL de soro (62,5 µL de cada indivíduo constituinte do grupo) e 4750 µL de TBS-T, fazendo o volume final de 5000 µL.

As membranas com extrato de Oliveira e Salsola foram colocadas em tubos com os diferentes soros e em seguida, colocados a agitar *overnight*, a 4°C. No dia seguinte, foram realizadas lavagens, seguindo-se incubação com IgG de ratinho anti-IgE humana (diluição de 1:30.000 em TBS-T) e colocado em rotação durante 2 horas. Seguiu-se nova série de lavagens e subsequente incubação com anticorpo anti-IgG de ratinho conjugado com peroxidase (I6510, *Sigma-Aldrich*, diluição 1:10.000 em TBS-T), durante 2h à temperatura ambiente. No final das 2 horas, as membranas foram retiradas dos tubos e foi-lhes aplicado TMB para a respetiva revelação, até ao aparecimento das bandas e as membranas foram fotografadas para posterior análise.

3.5.3.4. Detecção de proteínas dos EPP por soros individuais, com e sem inibição.

Para além da obtenção dos alergogramas com pools de soros, ainda foram obtidos alergogramas individuais, sem inibição e com inibição dos soros, estes últimos para estudar a reatividade cruzada entre a *O. europaea* e a *S. kali*. Num dos estudos, foi realizada a separação de EPP de *S. kali*, sendo os soros dos indivíduos inibidos com EPP de *O. europaea*. No outro, foi realizado o estudo contrário, com separação de EPP de *O. europaea* e inibição dos soros dos indivíduos com EPP de *S. kali*.

Os soros utilizados foram diluídos de 1:20 (50 µL de soro de paciente com 1950 µL de TBS-T). Foram ainda preparados soros inibidos, do seguinte modo: cortaram-se pedaços com cerca de 1 cm² de membrana de PVDF previamente ativada, e colocaram-se numa caixa de petri bem afastados uns dos outros; foi aplicado EPP de cada um dos tipos polínicos em estudo (caixas separadas para os dois tipos polínicos) sobre esses pedaços de membrana e incubados a 4°C “*overnight*”; para inibir os soros, um desses pedaços foi adicionado a um tubo de soro diluído, e fez-se uma incubação durante 30 min, com agitação; findo esse período, os pedaços de membrana foram retirados - consideram-se esses os soros inibidos.

A SDS-PAGE para separação das proteínas dos EPP decorreu de forma semelhante à anteriormente descrita, com a diferença de que a amostra foi colocada em poço contínuo. Procurou-se que a massa de proteína total aplicada de cada EPP fosse equivalente à dos estudos anteriores.

Após a transferência ser realizada, as membranas foram cortadas em 12 tiras equivalentes (duas para cada indivíduo), e posteriormente colocadas a incubar em tubos individuais, a 4°C “*Overnight*”, um tubo com o soro sem inibição e outro tubo com o soro inibido. Em cada estudo, preparou-se um par de tubos (não inibido e inibido) para cada indivíduos.

Todos os procedimentos subsequentes à incubação dos soros foram equivalentes aos descritos na secção anterior.

4. Resultados e Discussão

4.1. Identificação e caracterização dos alérgenos Profilina, Polcalcina e Ole e 1 e Ole e 1 like nos extratos polínicos de *S. kali* e *O. europaea*.

Nos capítulos da introdução relativos à *S. kali* e à *O. europaea* foram descritos diversos alérgenos de pólen destas espécies, incluindo o Ole e 1, alérgeno proveniente da *O. europaea* e o Sal k 5, alérgeno proveniente da *S. kali*, similar ao Ole e 1 (designado também *Ole e 1-like*), bem como a profilina e a polcalcina, pan-alérgenos identificáveis em *O. europaea* (Ole e 2 e Ole e 3, respetivamente) e em *S. kali* (Sal k 4 e Sal k 7, respetivamente). Pretende-se então fazer uma caracterização da massa molecular dos alérgenos Ole e 1, profilina e polcalcina nos EPP de *S. kali* e *O. europaea*, que possam sustentar a identificação destes alérgenos nos alergogramas.

A figura 8 mostra o resultado de um blot identificando o Ole e 1 e Ole e 1-like (Ver seção 3.5.3.1). Os valores de massa molecular calculados para o alérgeno Ole e 1 (de *O. europaea*) e o Ole e 1-like (Sal k 5, de *S. kali*) estão apresentados na tabela 5, sendo estes uma média de 2 experiências. As massas moleculares de Ole e 1 determinadas nas condições da nossa experiência foram $18,06 \pm 0,11$ e $7,25 \pm 0,21$ kDa para Ole e 1 e Ole e 1-like (correspondente ao Sal k 5, *S. kali*), respetivamente, evidenciando que a massa para o Sal k 5 é ligeiramente inferior (figura 8 e tabela 5).



Figura 8 - Imagem da membrana de *Western blot* com identificação de Ole e 1 e Ole e 1-like. Marcação imunológica de acordo com a seção 3.5.3.1. (n= 2).

Tabela 5 - Massa molecular obtida para Ole e 1 e Ole e 1-like.

Espécie	Alergénio	Massa Molecular (kDa)
Oliveira	Ole e 1	18,06 ± 0,11
Salsola	Ole e 1-like	17,25 ± 0,21

Estas massas estão em concordância com as descritas na literatura, 18,5 kDa para Ole e 1 (Villalba et al., 1993) e 17,6 kDa para Sal k 5 (Castro et al., 2014).

Outro alergénio relevante, por ser um pan-alergénio, é a profilina, uma proteína de ligação à actina (como referido na introdução 1.5.1.1 e 1.5.1.2), que são os alergénios Ole e 2 e Sal k 4 em oliveira e salsola, respetivamente.

Os valores de massa molecular relativos à profilina apresentados (Figura 9 e tabela 6), foram de 14,6 kDa para Sal k 4 e de 14,3 kDa para Ole e 2, bastante semelhantes entre si. Os valores de massa molecular quando comparados os valores descritos pela literatura, são semelhantes o alergénio Sal k 4 (14,4 kDa) (Assarehzadegan et al., 2009), e para o alergénio Ole e 2 (15 kDa) (Rodri, 2012). Os valores apresentados são relativos a uma única atividade, sendo estes obtidos com recurso ao procedimento descrito em 3.5.3.2.



Figura 9 - Imagem da membrana de Western blot com identificação de profilina. A membrana foi incubada com anti-profilina. O – Oliveira; S – Salsola (n=1).

Tabela 6 - Valor de massa molecular obtido para a profilina em *S. kali* e *O. europaea*.

Espécie	Alergénio	Massa Molecular (kDa)
Oliveira	Ole e 2	14,3
Salsola	Sal k 4	14,6

A polcalcina por sua vez pertence à família das proteínas de ligação ao ião Ca^{2+} , estando envolvida no controlo dos níveis de cálcio intracelular e são, respetivamente, os alergénios Ole e 3 e Sal k 7, de pólen de oliveira e salsola (Cases et al., 2014). Um procedimento similar foi aplicado novamente para os EPP de *O. europaea* e para a *S. kali* mas, desta vez, de forma a caracterizar a polcalcina nas duas espécies (Ver seção 3.5.3.2.). A figura 10 apresenta o resultado do blot, de forma a determinar a massa molecular da polcalcina para as duas espécies e permite observar que possuem valores similares para as duas espécies. Os valores de massa molecular calculados para a polcalcina da *S. kali* e da *O. europaea*, estão apresentados na tabela 7, sendo estes respetivamente 12,7 kDa e 12,6 kDa, relativos a uma atividade.

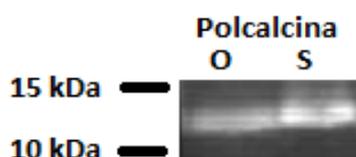


Figura 10 - Imagem da membrana de Western blot com identificação de Profilina. A membrana de PVDF, sendo a membrana incubada com anti-polcalcina. (N=1).

Tabela 7 - Valor de massa molecular obtido para polcalcina em *S. kali* e *O. europaea*.

Espécie	Alergénio	Massa Molecular (kDa)
Oliveira	Ole e 3	12,6
Salsola	Sal k 7	12,7

Os valores descritos na literatura para a polcalcina Sal k 7 e Ole e 3 são, respetivamente, 8,5 kDa (Tehrani et al., 2010) e 9,5 kDa (Villalba & Salinas, 2006). Quando comparados com os valores obtidos, é possível observar que obtemos valores com massa molecular cerca de 4 kDa mais elevada que nos valores descritos na literatura, o que pode estar relacionado com as condições experimentais de separação na SDS-PAGE.

Contudo, como os perfis de IgE serão determinados nas mesmas condições experimentais e utilizando o mesmo padrão, os valores de massa molecular aqui calculados poderão servir-nos de referência interna na identificação destes alergénios nos alergogramas a ser realizados.

4.2. Estudo de alergogramas obtidos com *pools* de soros

Neste subcapítulo procurou analisar-se o perfil proteico com reconhecimento de IgE (alergogramas) dos EPP de *O. europaea* e *S. kali*, utilizando pools de soros exibindo sensibilização distinta: *pool* de soros sensibilizados a *O. europaea* (IgE O⁺ S⁻); *pool* de soros sensibilizados a *S. kali* (IgE O⁻ S⁺); *pool* de soros sensibilizados a ambos os tipos polínicos (IgE O⁺ S⁺); *pool* de soros não sensibilizados, controlo negativo (IgE⁻), com IgE total < limite de deteção.

Foi realizado o estudo com o EPP de *S. kali* e *O. europaea*. O esquema da membrana é apresentado na figura 11, que apresenta as diferentes bandas reconhecidas para os diferentes soros.

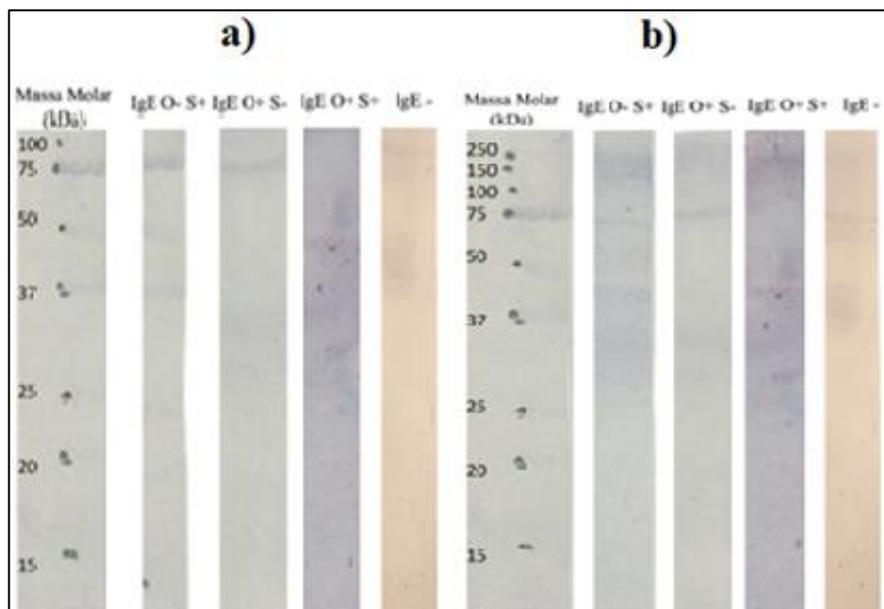


Figura 11 - Imagem das membranas de *Western blot*, de EPP de *S. kali* (a) e *O. europaea* (b). Os blots são representativos de duas experiências independentes.

A análise dos blots mostra que, à exceção do soro controlo, em todas as outras situações se detetaram proteínas do EPP de *S. kali* IgE-reativas. Os resultados da análise das massas moleculares e das densidades das bandas imunorreativas está apresentada na Figura 12. A *pool* IgE O⁻ S⁺ (Figura 12, barras vermelhas) permitiu detetar 13 bandas, das quais as bandas com 55, 44, 25 e 22 kDa possuem maior densidade. É possível observar que para a *pool* IgE O⁺ S⁻ (figura 12, barras azuis) se identificaram 11 bandas

imunorreativas, compreendidas entre 83 e 11 kDa. Das 11 bandas reconhecidas, destacam-se as bandas com 56, 44, 34 e 23 kDa, exibindo maior densidade. A incubação com a pool de soros IgE O⁺ S⁺ permitiu reconhecer 15 bandas, e desta feita, as bandas que têm maior densidade são as bandas com 74, 63, 51, 32, 21, 15 e 11 kDa, como é apresentado na figura 12 (barras verdes).

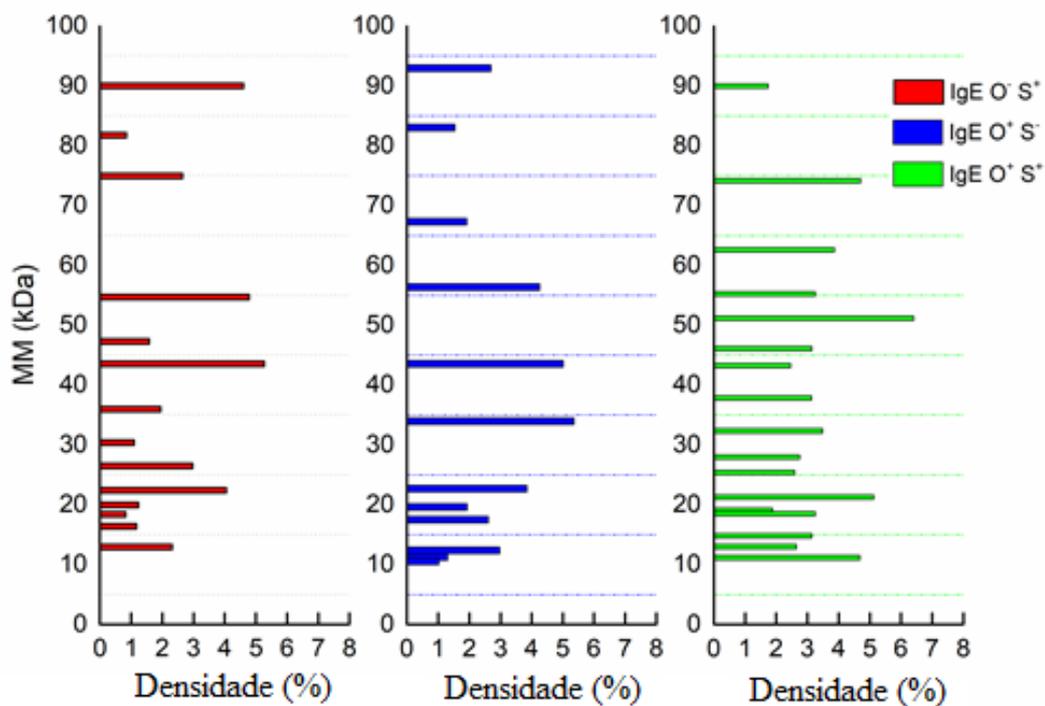


Figura 12 - Massas moleculares e densidades das bandas proteicas imunorreativas ao EPP de *S. kali*. Representativo de N=2 experiências.

É de realçar que a banda compatível com Sal k 1, foi identificada pelos soros IgE O⁻ S⁺ ($36,0 \pm 2,0$ kDa) e IgE O⁺ S⁺ ($32,3 \pm 3,5$ kDa), enquanto as bandas 44, 18 e 12 kDa foram identificadas por todos os soros. Tendo em conta a massa molecular, estas bandas poderão corresponder aos alergénios Sal k 2, ao Sal k 5 (Ole e 1-like) e ao panalergénio polcalcina (Sal k 7), respetivamente, em concordância com os resultados anteriores (seção 4.1, tabela 7) e com a literatura. Para além destes, foi ainda possível detetar o alergénio Sal k 3 (banda de $81,8 \pm 0,85$ kDa) pelo grupo IgE O⁻ S⁺. A análise das bandas imunomarcadas relativamente ao EPP de *O. europaea* está apresentado na Figura 13.

Pode observar-se que a marcação com a *pool* de soros IgE O⁺ S⁻ permitiu detetar 14 bandas, compreendidas entre 10 a 86 kDa, das quais se destacam as bandas de 70, 25,

19, 16 e 10 kDa, que apresentaram uma maior densidade, (barras a azul da Figura 13). As bandas com $19,6 \pm 0,25$ kDa, $16,5 \pm 0,22$ kDa e 10,6 kDa podem estar relacionadas com os alérgenos Ole e 1, Ole e 5 e Ole e 6, respetivamente, em conformidade com os resultados obtidos neste trabalho na secção 4.1, tabela 5 e com *Arilla* e colaboradores (Arilla et al., 2010). Com a pool de soros IgE O⁺ S⁺, foram detetadas 16 bandas, no intervalo de 85 a 12 kDa, sendo as bandas de 68, 44, 36, 23, 20 e 12 kDa as de maior densidade, como é possível observar na Figura 13 (barras a verde) (Assarehzadegan et al., 2009).

Na pool de soros IgE O⁻ S⁺, foram reconhecidas 11 bandas, com valores compreendidos no intervalo de 91 a 13 kDa, das quais se destacam as bandas com 91, 71, 30 e 17 kDa, com uma maior densidade quando comparadas com as restantes bandas (barras a vermelho da Figura 13).

É de realçar que a banda $19,6 \pm 0,25$ kDa foi reconhecida pelos soros IgE O⁺ S⁺ e IgE O⁺ S⁻, ambos positivos para *O. europaea*, e que as bandas $16,5 \pm 0,22$ kDa e 10,6 kDa foram reconhecidas por todos os soros. A pool de soros de controlo para o EPP de *O. europaea*, não apresentou bandas (Figura 11 b).

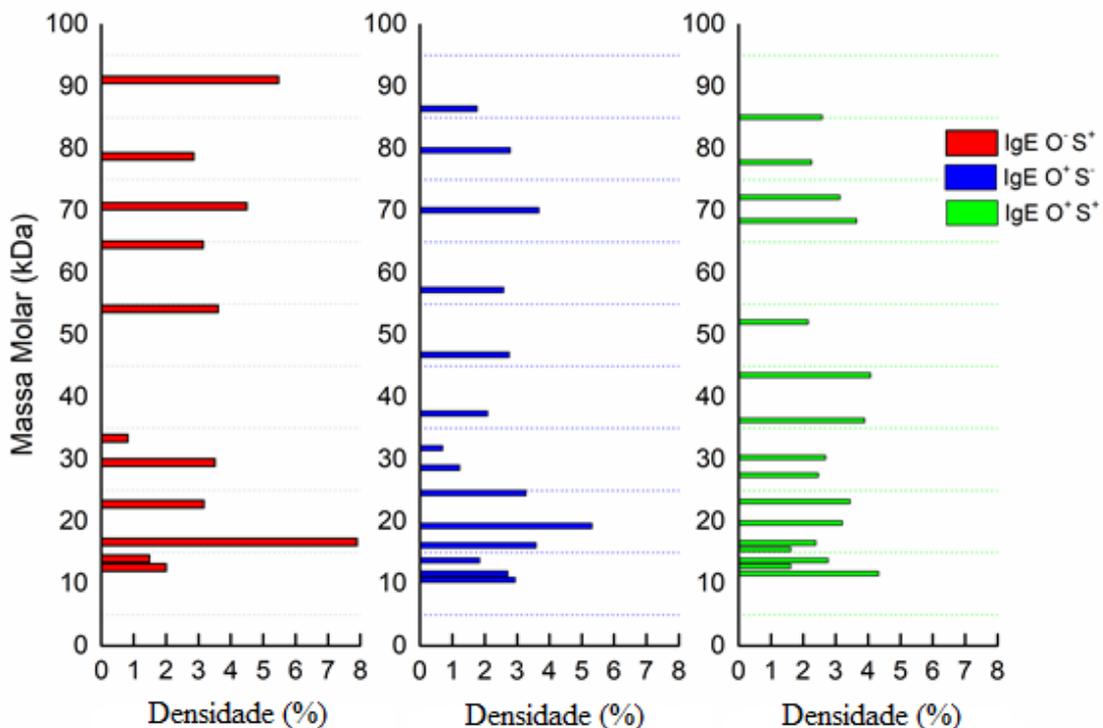


Figura 13 - Massas moleculares e densidades das bandas proteicas imunorreativas do EPP de *O. europaea*. Representativo de N= 2 experiências.

Os resultados atrás apresentados sugerem a possibilidade de ocorrer reatividade cruzada no reconhecimento de alérgenos entre pólen de *S. kali* e *O. europaea*, em particular o facto de ocorrer reconhecimento de bandas proteicas do EPP de *O. europaea*, pelos soros IgE O⁻ S⁺ bem como pelo reconhecimento de bandas em EPP de *S. kali* pelos soros IgE O⁺ S⁻.

4.3. Estudo da reatividade cruzada entre *O. europaea* e *S. kali*

Neste capítulo foi realizado um estudo aos alergogramas individuais para os EPP de *O. europaea* e *S. kali* acompanhado de um estudo de inibição como forma de esclarecer a reatividade cruzada entre as duas espécies de acordo com a seção 3.5.3.4. Serão assim, em primeira instância, analisados os perfis de IgE específica de indivíduos com sensibilização a *O. europaea* e/ou *S. kali*, seguindo-se o estudo da inibição, em que os soros dos indivíduos são previamente incubados com EPP de uma das espécies, de forma a imobilizar e retirar as IgE específicas para essa espécie (a que se designou soros inibidos – I), e posteriormente utilizados para detetar os alérgenos. Estes serão comparados com os alergogramas obtidos utilizando soros não inibidos (NI).

Este procedimento foi realizado quer para os alergogramas relativos a *O. europaea*, com pré-incubação dos soros com EPP de *S. kali*, quer para alergogramas relativos a *S. kali*, inibindo os soros com EPP de *O. europaea* (Ver seção 3.5.3.3). De referir que os pacientes 4, 6, 7 e 8 pertencem ao grupo IgE O⁻S⁺, os pacientes 11, 12, 14 e 16 pertencem ao grupo IgE O⁺S⁻, enquanto que os pacientes 1, 2, 3 e 5 pertencem ao grupo IgE O⁺S⁺ (ver métodos, seção 3.2, tabela 4).

Na figura 14 são apresentados os alergogramas NI e I obtidos para EPP de *S. kali*, enquanto que na tabela 8 é apresentada uma análise descritiva das bandas reconhecidas por cada indivíduo nos diferentes soros.

Sensibilização a *Salsola kali* e *Olea europaea*: Estudo de reatividade cruzada

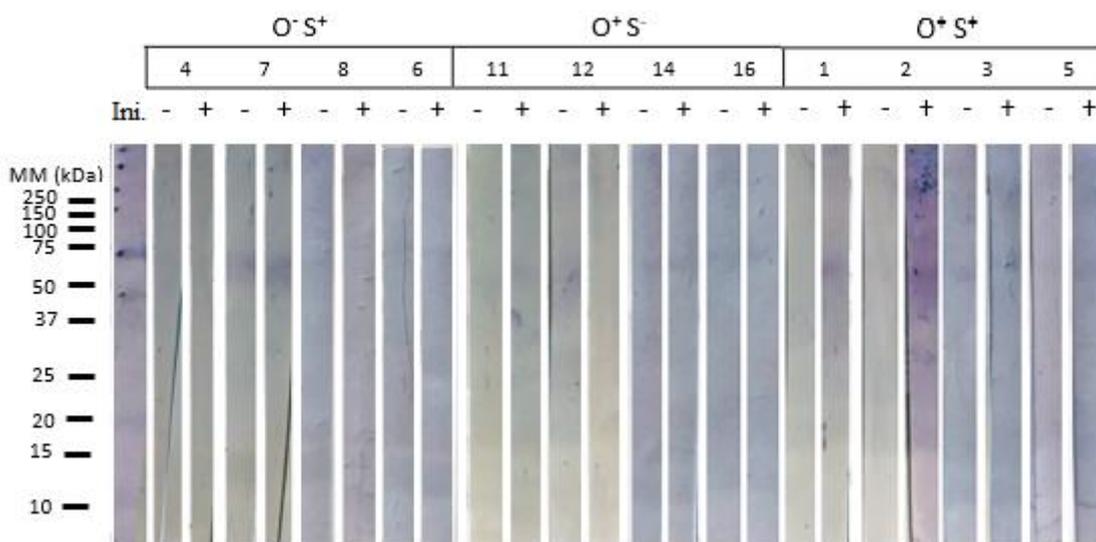


Figura 14 - Imagem dos alergogramas individuais obtidos para *S. kali*. Em Inj. apresentam-se resultados para os soros não inibidos (-) e previamente inibidos com EPP de *O. europaea* (+). A primeira lane mostra o padrão de massas moleculares.

A tabela 8 mostra as bandas reconhecidas por cada indivíduo (+) permitindo identificar aquelas que foram reconhecidas maioritariamente em cada grupo.

Tabela 8 - Análise descritiva dos alergogramas. Individuais a EPP de *S. kali*.

MM (kDa)	IgE O ⁻ S ⁺					IgE O ⁺ S ⁻					IgE O ⁺ S ⁺				
	4	7	8	6	N	11	12	14	16	N	1	2	3	5	N
96,3±7,0	-	-	-	-	0	-	-	-	+	1	+	+	-	-	2
81,8±2,5	-	-	-	-	0	-	-	-	+	1	+	-	-	-	1
73,2±3,7	+	-	+	+	3	+	+	+	+	4	+	-	+	+	3
62,8±4,1	+	+	+	+	4	-	+	+	+	3	+	+	+	+	4
56,8±4,0	+	+	-	-	2	-	+	+	+	3	+	+	+	+	4
48,6±4,7	-	-	+	+	2	-	+	+	+	3	-	+	+	+	3
40,5±2,1	+	+	+	+	4	+	+	+	+	4	+	+	+	+	4
34,0±1,0	-	-	-	+	1	-	-	+	+	2	+	+	-	-	2
31,0±1,7	-	+	-	+	2	-	-	+	+	2	-	-	+	-	1
26,0±1,5	-	-	-	-	0	+	-	+	-	2	-	+	+	+	3
22,0±1,0	-	-	-	+	1	+	+	+	-	3	-	+	+	+	3
17,7±1,1 ^{*1}	+	+	-	+	3	-	+	+	+	3	-	-	-	+	1
14,4±0,6 ^{*2}	-	-	+	+	2	-	-	-	+	1	-	+	+	+	3
11,9±1,0 ^{*3}	+	-	+	+	3	-	-	+	+	2	-	+	+	+	3
10,5±0,8	-	-	-	+	1	-	+	-	+	2	-	+	-	-	1
9,2±0,9	-	-	-	-	0	-	-	+	+	2	-	+	-	+	2

*¹ Ole e 1-like; *² profilina; *³ polcalcina (segundo os dados obtidos na secção 4.1)

Em primeira instância observou-se que as bandas 73,2±3,7 kDa, 62,8±4,1 kDa e 40,5±2,1 kDa foram maioritariamente reconhecidas pelos 3 grupos (Tabela 8). Um tipo similar de análise foi realizado para os grupos com IgE positiva para *S. kali* (IgE O⁻ S⁺ e IgE O⁺ S⁺), sendo apenas 1 banda, 11,9±1,0 kDa, seletivamente reconhecida pelos dois grupos, enquanto as bandas de 56,8±4,0 kDa, 48,6±4,7 kDa e 22,0±1,0 kDa foram reconhecidas pelos grupos sensibilizados a *O. europaea*, IgE O⁺ S⁻ e IgE O⁺ S⁺, (Tabela 8).

De seguida as diversas bandas detetadas foram sujeitas à análise da sua densidade (em percentagem); cujos resultados estão apresentados na figura 15. A figura mostra que para o grupo IgE O⁻S⁺, as bandas mais intensas, foram as de massa molecular 73,2±3,7; 62,5±4,1; 56,8±4,0; 48,6±4,7; 40,5±2,1 e 11,9±1,0 kDa, no grupo IgE O⁺S⁺ destacaram-se as bandas de 62,5±4,1; 56,8±4,0; 40,5±2,1 e 22,0±1,0 kDa enquanto no grupo IgE O⁺S⁻ não existem bandas que se destaquem, pois todas elas apresentam uma densidade em média similar e compreendida entre 2 e 7 % (Figura 15).

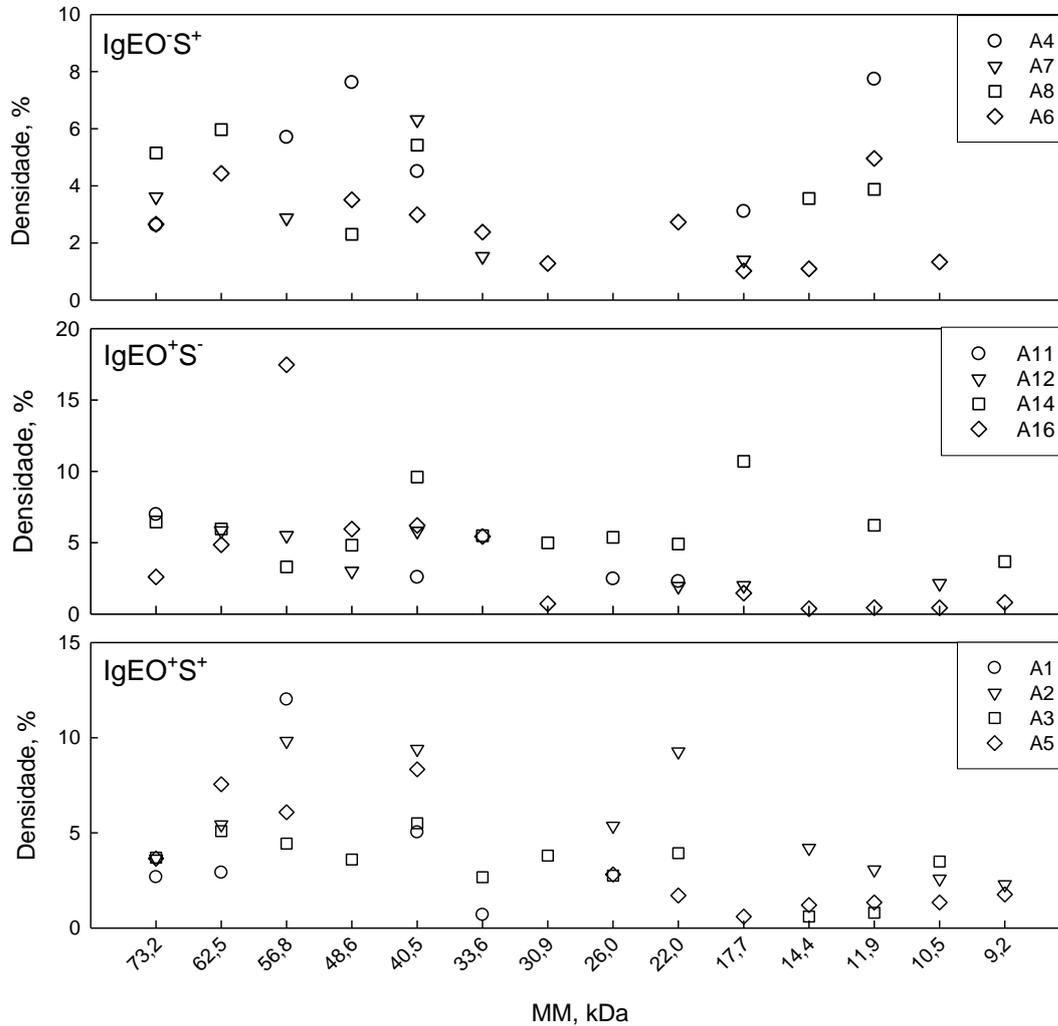


Figura 15 - Densidade das bandas reconhecidas em EPP de *S. kali*. Resultados obtidos de 2 experiências independentes.

Das bandas referenciadas, algumas podem corresponder a alergénios conhecidos, nomeadamente o Sal k 1 que pode ser associado à banda de $40,5 \pm 2,1$ kDa (Tehrani et al., 2010), o Sal k 3 pode ser associado à banda $48,6 \pm 4,7$ kDa (Assarehzadegan et al., 2011), o Sal k 4 que é conhecido como profilina da *S. kali*, de massa molecular $14,4 \pm 0,6$ kDa (Ver seção 4.1, tabela 6, deste trabalho; (Arilla et al., 2010)), enquanto que a banda $17,7 \pm 1,1$ kDa corresponderá ao Sal k 5 (ou Ole e 1-like como referido ao longo do trabalho), massa molecular confirmada neste trabalho (Ver seção 4.1, tabela 5; (Assarehzadegan et al., 2009)); também a banda de massa molecular $11,9 \pm 1,0$ kDa foi

Sensibilização a *Salsola kali* e *Olea europaea*: Estudo de reatividade cruzada

possível associar ao alergénio Sal k 7, polcalcina da *S. kali*, cuja massa, confirmada neste trabalho em 12,7 kDa, se encontra dentro do intervalo de confiança correspondente à massa obtida nos alergogramas (Ver seção 4.1, tabela 7; (Pereira et al., 2006)).

Apresentam-se na tabela 9 as percentagens de inibição das diferentes bandas proteicas para cada indivíduo, de forma a avaliar a existência de reatividade cruzada entre as duas espécies. Considerou-se que apenas valores de inibição superiores a 20% são relevantes. No geral observou-se inibição em diversas bandas nos alergogramas individuais.

Tabela 9 - Percentagens de redução da densidade das bandas (inibição) de *S. kali*, reconhecidas por cada um dos soros, após tratamento destes com EPP de *O. europaea*.

MM (kDa)	IgE O ⁻ S ⁺				IgE O ⁺ S ⁻				IgE O ⁺ S ⁺			
	4	7	8	6	11	12	14	16	1	2	3	5
73,2±3,7	0		2	0	100	3	0	7	0		0	100
62,8±4,1	22	14	5	0		100	0	1	0	0	0	30
56,8±4,0	100	100				100	0	0	100	30	0	1
48,6±4,7			7	0		10	0	3		100	0	
40,5±2,1 ^{*1}	100	100	5	0	0	0	5	2	24	0	0	3
34,0±1,0				2			24	0	0		10	
31,0±1,7		0		100			100	100			21	
26,0±1,5					10		100			100	20	23
22,0±1,0					100	100	15			43	100	0
17,7±1,1 ^{*2}	23	100		0		100	7	0				0
14,4±0,6 ^{*3}			100	100				0		0	41	0
11,9±1,0 ^{*4}	80		4	100			0	0		100	33	0
10,5±0,8				0		100		100		100		
9,2±0,9							24	100		100		100

^{*1}Sal k 1 / Sal k 2; ^{*2}Ole e 1-like; ^{*3}profilina; ^{*4}polcalcina (segundo os dados obtidos na seção 4.1);

Os pan-alergénios já identificados neste trabalho (Ver seção 4.1), bem como o alergénio major da *S. kali* (Sal k 1), foram analisados mais detalhadamente.

Começando pela banda de 40,5±2,1 kDa, que poderá ser associada ao Sal k 1, observou-se inibição em 3/8 casos dos grupos sensibilizados a salsola, tendo 2 destes ocorrido no grupo IgE O⁻S⁺; não se observou inibição no grupo IgE O⁺S⁻. Estes resultados, sugerem que existem proteínas nesta banda que podem originar reatividade cruzada na medida em que IgE específica para salsola pode ter sido removida pelo extrato de oliveira.

O facto de não se ter observado inibição no grupo IgE O⁺S⁻ sugere a ocorrência de imunoreconhecimento de epítomos no blot que podem não estar disponíveis nas proteínas nativas, justificando o facto de serem detetadas por este grupo mas não inibidas pelo EPP de oliveira.

No caso do Sal k 5 (Ole e 1-like), observou-se reconhecimento por 7 indivíduos distribuídos entre os 3 grupos, tendo-se observado inibição em 3 casos, 2 no grupo IgE O⁻S⁺ e 1 no IgE O⁺S⁻; também neste caso os resultados sugerem reatividade cruzada em cerca de metade dos indivíduos. Mais uma vez, o grupo IgE O⁺S⁻ revela reconhecimento de proteínas nesta banda que não foi inibida pelo EPP de oliveira; uma vez que podem encontrar-se múltiplas proteínas nesta banda, pode acontecer que estejam a ser marcadas outras proteínas no blot para além de Sal k 5, por estes indivíduos sensibilizados a oliveira cujos IgE não foram removidos pelos EPP de oliveira e cuja identificação não é possível nesta experiência.

Estas observações repetiram-se para a profilina (Sal k 4) e para a polcalcina (Sal k 7), em que também se observou inibição em metade dos casos. De realçar que neste caso estas proteínas foram maioritariamente reconhecidas pelos indivíduos sensibilizados a salsola ou a ambos os tipos polínicos e minoritariamente pelos indivíduos sensibilizados apenas a oliveira. Estes dados sugerem também a possibilidade de ocorrência de reatividade cruzada entre as profilinas e as polcalcinas das duas espécies, como sugere a literatura pela elevada homologia que se conhece nestas famílias de proteínas (Landa-pineda et al., 2013)

Em suma, os soros com IgE específica apenas para *S. kali*, reconheceram diversas bandas o que revela a presença de reatividade cruzada entre as espécies, como já indiciavam os estudos anteriormente realizados com as *pools* de soros e confirmada com os resultados de inibição pelo EPP de oliveira.

Os resultados que se seguem mostram os valores obtidos em blots de EPP de *O. europaea* inibidos e não inibidos com EPP de *S. kali*. A figura 16 mostra os alergogramas individuais obtidos e a tabela 10 resume uma análise descritiva dos mesmos.

Na figura 16 é possível observar a presença de duas bandas próximas, no intervalo de 75 a 50 kDa, presente em todos os soros com IgE positivos para *O. europaea* (IgE O⁻S⁻ e IgE O⁺S⁺).

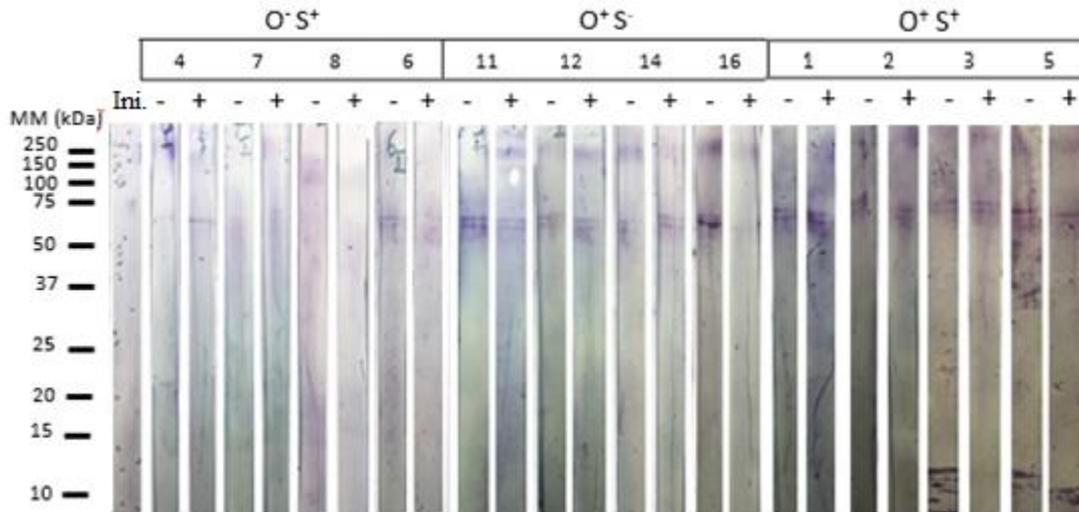


Figura 16 - Imagem dos alergogramas individuais obtidos para *O. europaea*. Em Ini. apresentam-se resultados para os soros não inibidos (-) e previamente inibidos com EPP de *S. kali* (+). A primeira lane mostra o padrão de massas moleculares.

A análise das bandas maioritariamente detetadas, estão apresentadas na tabela 10. Em primeiro lugar observou-se que as bandas $61,7 \pm 3,9$ e $55,5 \pm 3,2$ kDa foram maioritariamente reconhecidas pelos 3 grupos. A banda de $71,6 \pm 4,3$ kDa e a banda $39,4 \pm 2,0$ kDa foi reconhecida apenas pelos grupos sensibilizados a *O. europaea*. Os grupos com IgE positiva para *S. kali* (IgE O⁻S⁺ e IgE O⁺S⁺) reconhecem maioritariamente a banda com massa molecular $27,0 \pm 0,9$ kDa (tabela 10).

Tabela 10 - Análise descritiva dos alergogramas. Individuais a EPP de *O. europaea*.

MM (kDa)	IgE O ⁺ S ⁺					IgE O ⁺ S ⁻					IgE O ⁺ S ⁺				
	4	7	8	6	N	11	12	14	16	N	1	2	3	5	N
91,2±2,4	-	-	-	-	0	+	+	-	-	2	+	+	-	-	2
81,0±3,7	-	-	-	-	0	+	+	-	-	2	-	-	+	-	1
71,6±4,3	-	-	-	-	0	+	+	-	+	3	+	+	+	+	4
61,7±3,9	+	+	+	+	4	+	+	+	+	4	+	+	+	+	4
55,5±3,2	-	+	+	+	3	+	+	+	+	4	+	+	+	+	4
49,9±3,2	-	+	-	+	2	-	-	+	+	2	+	+	+	-	3
42,7±0,7	+	-	-	-	1	-	-	-	-	0	+	+	-	-	2
39,4±2,0	-	-	-	-	0	+	+	+	-	3	+	-	-	-	1
37,1±0,8	-	+	-	-	1	+	-	-	-	1	+	+	-	-	2
33,5±0,7	-	-	-	-	0	+	-	-	+	2	+	+	+	+	4
30,2±0,6	-	-	-	-	0	+	-	-	-	1	+	-	-	-	1
27,0±0,9	-	+	+	+	3	+	-	-	-	1	+	+	-	-	2
23,4±0,6	+	+	-	-	2	+	+	-	+	3	+	-	-	+	2
21,5±1,0	+	-	-	-	1	-	-	-	-	0	+	+	-	-	2
19,4±0,9	-	+	-	+	2	+	+	-	-	2	+	+	-	+	3
17,5±0,6 ^{*1}	-	-	-	+	1	+	-	-	+	2	+	+	+	+	4
15,6±0,4	-	+	+	-	2	-	+	-	+	2	+	+	+	+	4
13,8±0,5 ^{*2}	-	+	-	-	1	+	+	-	-	2	+	+	-	-	2
12,2±0,2 ^{*3}	+	-	-	+	2	-	+	-	-	1	+	-	-	+	2
10,5±0,7	-	-	-	+	1	-	+	+	-	2	-	+	-	-	1

*¹ Ole e 1; *² profilina; *³ polcalcina (segundo os dados obtidos na secção 4.1)

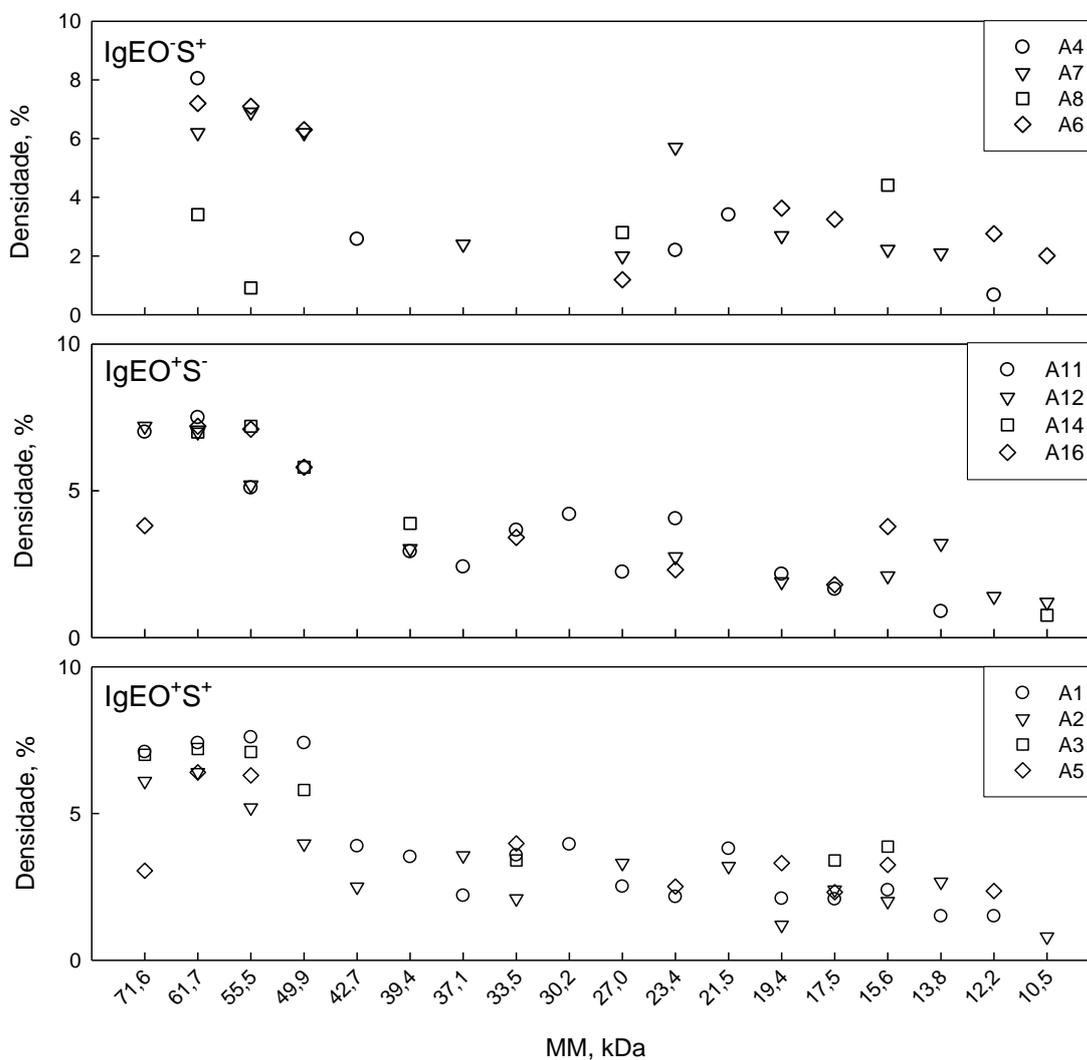


Figura 17 - Densidade das bandas reconhecidas em EPP de *O. europaea*. Resultados obtidos de 2 experiências independentes.

Algumas das bandas identificadas apresentam massas moleculares correspondentes a alergénios major descritos em pólen de *O. europaea* bem como de alguns pan-alergénios conhecidos. Começando pelo alergénio major Ole e 1 que possui uma massa molecular de $18,06 \pm 0,11$ kDa, identificado anteriormente neste trabalho (Ver seção 4.1) e (Cases et al., 2014) a qual por sua vez poderá ser relacionada com a banda de $17,5 \pm 0,6$ kDa. O Ole e 2, a profilina, foi identificado com uma massa de 14,3 kDa (Ver seção 4.1, tabela 6 e (Landa-pineda et al., 2013)), que por sua vez pode estar relacionado com a banda de $13,8 \pm 0,5$ kDa, o Ole e 3 (polcalcina) apresentou uma massa de 12,6 kDa

(Ver secção 4.1, tabela 7 e (Boluda et al., 1999)) pode estar relacionada com a banda de 12,2±0,2 kDa. Para além destes foi também possível identificar algumas bandas com massas moleculares, nomeadamente, compatíveis com os alergénios Ole e 4 (33,5±0,7 kDa), Ole e 5 (15,6±0,4 kDa) (Scala et al., 2014), Ole e 8 (21,5±1,0 kDa) (Cases et al., 2014), Ole e 11 (39,4±2,0 kDa), Ole e 13 (23,4±0,6 kDa) (Castro et al., 2014) e Ole e 14 (49,9±3,2 kDa) (Mas et al., 2017).

Em seguida, e como anteriormente, foi calculada a percentagem de inibição para as diversas bandas de *O. europaea* detetadas, após inibição dos soros com EPP de *S. kali*. As percentagens de inibição das bandas para os diferentes soros estão apresentadas na tabela 11.

Tabela 11 - Percentagens de redução da densidade das bandas (inibição) de *O. europaea*, reconhecidas por cada um dos soros, após tratamento destes com EPP de *S. kali*.

MM (kDa)	IgE O- S+				IgE O+ S-				IgE O+ S+			
	4	7	8	6	11	12	14	16	1	2	3	5
71,6±4,3					0	1		100	1	0	100	100
61,7±3,9	8	2	6	3	0	1	0	1	1	6	56	5
55,5±3,2		1	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0
49,9±3,2		0		0			9	5	3	100	100	
42,7±0,7	7								100	100		
39,4±2,0					28	100	13		9			
37,1±0,8		0			100				0	100		
33,5±0,7					100			0	0	0	6	7
30,2±0,6					26				100			
27,0±0,9		100	100	100	100				0	6		
23,4±0,6	100	9			100	100		100	0			100
21,5±1,0	0								8	100		
19,4±0,9		0		100	3	0			5	0		100
17,5±0,6* ¹				100	100			100	0	17	0	9
15,6±0,4		100	5			100		100	100	100	12	8
13,8±0,5* ²		0			0	100			100	100		
12,2±0,2* ³	100			0		100			7			100
10,5±0,7				0		0	0			0		

*¹ Ole e 1; *² profilina; *³ polcalcina (segundo os dados obtidos na secção 4.1)

Tal como anteriormente foi realizado, concentramo-nos na análise da inibição do alergénio major Ole e 1, pelo facto da salsola expressar alergénios homólogos Ole e 1-like, e dos pan-alergénios profilina e polcalcina, cujas massas foram determinados em condições experimentais similares na secção 4.1.

Começando pelo Ole e 1 este apresentou deteção em 7 casos, foi inibido em 3 casos, sugerindo reatividade cruzada entre as duas espécies em quase metade dos casos (Tabela 11). De seguida foi analisada a profilina (Ole e 2, com massa de 13,8 kDa), esta banda apresentou inibição total na maioria dos casos (3 em 5 casos), por fim o mesmo se seguiu para a polcalcina (Ole e 3, com massa 12,2 kDa), nos quais também apresentou inibição total em 3 dos 5 casos registados, sugerindo a existências de reatividade cruzada entre as espécies em estudo.

Em suma, através da análise das bandas reconhecidas por cada paciente nos diferentes extratos e da inibição presente em cada uma das bandas para os diferentes indivíduos, foi possível averiguar que existe uma grande possibilidade de haver reatividade cruzada quando um individuo alérgico a *O. europaea* é exposto a *S. kali*, e vice-versa.

5. Conclusões

O conjunto de resultados apresentados ao longo dos capítulos 4.1, 4.2 e 4.3 permitiu determinar a massa de alguns alérgenos, nomeadamente, o Ole e 1 e Ole e 1-like, das profilinas e das polcalcinas de *O. europaea* e *S. kali*, dados muito úteis que permitiram proceder à identificação destes alérgenos nos alergogramas, diminuindo a ambiguidade associada à identificação levada a cabo pelos métodos apresentados.

Além disso, permitiu ainda esclarecer os alergogramas de grupos com sensibilização diferente e detetar a existência de reatividade cruzada entre diversos alérgenos destas espécies, aspeto de grande relevância na medida em que pode provocar reação alérgica em indivíduos não sensibilizados para uma dada espécie, o que pode explicar o aparecimento de alergias ou sintomas de polinose fora da época polínica das espécies para as quais têm sensibilização conhecida.

Este estudo contribui, assim, para esclarecer padrões complexos de resposta alérgica em indivíduos com sensibilização para *S. kali* e/ou *O. europaea*, o que por sua vez pode contribuir para refinar o diagnóstico clínico, permitir aos clínicos melhor aconselhar os seus doentes alérgicos e ajustar a medicação de acordo os calendários polínicos em causa. Em suma, os resultados expressos neste trabalho podem vir a contribuir para melhorar a gestão da polinose em alérgicos a *S. kali* e/ou *O. europaea* e, assim, contribuir para melhorar a sua qualidade de vida.

6. Referências Bibliográficas

- Alché, J. D. D., Mohamed, M., Castro, A. J., & Rodríguez-garcía, M. I. (2004). Ole e 1 , the Major Allergen from Olive (*Olea europaea* L .) Pollen , Increases its Expression and is Released to the Culture Medium during in vitro Germination, *45*(8), 1149–1157.
- Arilla, M. C., Ibarrola, I., Brena, S., Martínez, A., Colás, C., & Asturias, J. A. (2010). The Russian thistle (*Salsola kali*) pollen major allergen, Sal k 1, can be quantified in allergenic extracts and airborne pollen. *International Archives of Allergy and Immunology*, *152*(4), 319–326. <https://doi.org/10.1159/000288285>
- Assarehzadegan, M. A., Sankian, M., Jabbari, F., Noorbakhsh, R., & Varasteh, A. (2009). Allergy to *Salsola Kali* in a *Salsola Incanescens*-rich Area: Role of Extensive Cross Allergenicity. *Allergology International*, *58*(2), 261–266. <https://doi.org/10.2332/allergolint.08-OA-0041>
- Assarehzadegan, M. A., Sankian, M., Jabbari, F., Tehrani, M., Falak, R., & Varasteh, A. (2011). Identification of methionine synthase (Sal k 3), as a novel allergen of *Salsola kali* pollen. *Molecular Biology Reports*, *38*(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0078-2>
- Batanero, E., Crespo, J. F., Monsalve, R. I., Villalba, M., & Rodríguez, R. (n.d.). Food and drug reactions and anaphylaxis IgE-binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen , Ole e 1 proteinase K, 147–153.
- Batanero, E., Villalba, M., Monsalve, R. I., & Rodriguez, R. (1996). Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins : Evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen, *2*, 1264–1271.
- Boluda, L., Casanovas, M., & Fernandez-caldas, E. (1999). Determination of Ole e 1 by enzyme immunoassay and scanning densitometry . Validation by skin-prick testing, 17–26.
- Cases, B., Ibañez, M. D., Tudela, J. I., Sanchez-garcia, S., Rodriguez, P., Fernandez, E. A., ... Fernandez-caldas, E. (2014). Immunological cross-reactivity between olive and grass pollen : implication of major and minor allergens, 1–7.
- Castro, L., Mas, S., Barderas, R., Colás, C., García-Sellés, J., Barber, D., ... Villalba, M. (2014). Sal k 5, a member of the widespread ole e 1-like protein family, is a new allergen of russian thistle (*Salsola kali*) pollen. *International Archives of Allergy and Immunology*, *163*(2), 142–153. <https://doi.org/10.1159/000356345>
- Celenk, S. (2019). Detection of reactive allergens in long-distance transported pollen grains : Evidence from Ambrosia. *Atmospheric Environment*, *209*(October 2018), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.04.040>
- Landa-pineda, C. M., Guidos-fogelbach, G., Marchat-marchau, L., Arroyo-becerra, A., & Reyes-lópez, C. A. S. (2013). Artículo de revisión Profilinas: alergenos con relevancia clínica, 129–143.
- Mas, S., Oeo-santos, C., Cuesta-herranz, J., Díaz-perales, A., Colás, C., Fernández, J., ... Villalba, M. (2017). BBA - Proteins and Proteomics A relevant IgE-reactive 28 kDa protein identi fi

ed from *Salsola kali* pollen extract by proteomics is a natural degradation product of an integral 47 kDa polygalaturonase. *BBA - Proteins and Proteomics*, (April), 0–1.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.05.007>

Pereira, C., Valero, A., Loureiro, C., Dávila, I., Martínez-Cóccera, C., Murio, C., ... Palomino, R. (2006). Iberian study of aeroallergens sensitisation in allergic rhinitis. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 38(6), 186–194. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16929745>

Rodri, I. (2012). Characterization of Profilin Polymorphism in Pollen with a Focus on Multifunctionality, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030878>

Scala, E., Abeni, D., Bd, D. P., Paganelli, R., Locanto, M., Giani, M., ... Asero, R. (2014). Letter to the Editor. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.07.009>

Tehrani, M., Sankian, M., Assarehzadegan, M. A., Falak, R., Jabbari, F., & Varasteh, A. (2010). Immunochemical characterization of *Amaranthus retroflexus* pollen extract: Extensive cross-reactive allergenic components among the four species of *Amaranthaceae/Chenopodiaceae*. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 9(2), 87–95. <https://doi.org/09.02/ijaai.8795>

Thomson, C. A., & British, A. (2016). *IgG Structure and Function. Encyclopedia of Immunobiology* (Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.05002-5>

Villalba, M., Batanero, E., Lopez-otin, C., Sanchez, L. M., Monsalve, R. I., Gonzalez, M. A., ... Rodriguez, R. (1993). The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen, 869, 863–869.

Villalba, M., & Salinas, J. (2006). Ca²⁺-binding allergens from olive pollen exhibit biochemical and immunological activity when expressed in stable transgenic *Arabidopsis*, 273, 4425–4434. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05417.x>

Sites Consultados

[1] <https://lince.di.uevora.pt/polen/index.jsp> (Consultado a 21/04/2020)

[2] <http://www.allergome.org/> (Consultado a 25/11/2019)

Anexos

Anexo I

a) Material/Equipamento e Reagentes

- Material descartável
- Pinças
- Vidros de 0,75 mm de espessura *Bio-Rad*
- Tubos de *Falcon* e 50 e 15 mL
- Pipetas de *Pasteur*
- Filtros de papel
- Balões Volumétricos de 5mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL, 100 mL e 1000 mL
- Placas de 96 poços
- Pipetas Volumétricas
- Câmara de SDS-PAGE
- Membranas PDVF
- Fibras
- Conjunto de *Western-Blotting*
- Pompete
- Alíquotas de diversos volumes
- Vortex Labinco L46
- Centrifugadora *Hermle Z323K*
- Potenciômetro pH *Hanna instruments*
- Balança *Mettler HK 160*
- Leitor de microplacas

- Micropipetas P10, P100, P200, P1000 e P5000 com respectivas pontas
- Gobelets
- Esguicho

b) Soluções utilizadas

- SDS 10%

Foi dissolvido 10 gramas de SDS em 90 mililitros de água, com agitação suave. Foi perfeito até 100 mililitros, sendo guardado a temperatura ambiente até 6 meses.

- Acrilamida/Bis (Para 300 mililitros)

Foram adicionado num copo 87,6 gramas de Acrilamida e 2,4 gramas e N'-N'-bis-metileno-acrilamida com 300 mililitros, sendo em seguida a solução sujeita a filtração. Posteriormente foi armazenada a 4 graus Celcius.

- Tris-HCL 1,5 MM

Foram dissolvidas 18,15 gramas de Tris-HCL 1,5 MM em 60 mililitros de água destilada, o pH foi ajustado a 8,8. O volume foi perfeito até 100 mililitros, sendo em seguida a solução armazenada a 4 graus Celcius.

- Tris-HCL 0,5 MM

Foram dissolvidas 6 gramas em 60 mililitros de água destilada, o pH foi ajustado a 8,8. Em seguida o volume foi perfeito até 100 mililitros, sendo a solução armazenada a 4 graus Celcius.

- APS 10%

Foi pesado 0,025 gramas de APS, às quais foi adicionado 250 microlitros de água destilada. Após esta adição, a solução foi agitada no vortex.

- TBS

Foram misturadas 30,8 gramas de Tris com 87,66 gramas de NaCl, com um volume de 100 mililitros de água destilada.

- TBS-T (1 Litro)

Foram utilizados 100 mililitros de TBS, aos quais foi adicionada Água destilada até perfazer um volume de 1000 mililitros, sendo em seguida adicionado 1 mililitro de Tween 20.

Anexo II

Tabela 12 - Caracterização da população em estudo.

NH	POLEN	IgE TOTAL (U/ml)	IgE Olea (U/ml)	IgE Ole E1 (KU/L)	IgE Salsola (U/ml)	IgE Sal K1 (U/ml)	IgE Cheno	F. ANALIT	F. NAC	F. TC	PAPULA OLIVE (mm)	PAPULA SALSOLA (mm)	PAPULA CHENO (mm)	OTROS
SALSOLA + OLIVO														
alcazar 1	O+S	37,8	2,17	1,8	5,19		0,26	21/08/2012	03/01/1991	09/11/2011	6x4	8x6	7x5	gato, ligustrum
alcazar2	O+S	293	6,15	5,87	18,8	34,3		28/09/2017	23/04/1988	18/06/2016	12x9	7x4	9x4	0
alcazar 3	O+S	25,2	5,29	6,07	2,49		0,09	26/07/2012	23/05/1956	17/08/2011	4X4	6X6	6X3	0
alcazar 5	O+S	108,2	1,47	1,07	4,27			13/05/2011	31/12/1966	05/05/2011	7X6	7X5	10X8	plantago
SALSOLA														
alcazar 4	S	6,7	0,12	0,09	1,68	4,56		23/10/2018	01/05/1984	17/02/2012	5X4	7X4	4X3	0
alcazar 6	S	35,3	0,43	0	4,98	5,97		22/10/2018	26/08/1983	29/09/2018	0	8X7	0	plantago
alcazar 7	S	45,9	0,01	0	7,47	23,9	0,1	17/10/2018	05/06/1978	20/04/2018	0	14x10	5x4	0
alcazar 8	S	65,4	0,01	0	0,52		0,01	22/10/2018	21/10/1975	23/10/2018	0	(+)	(+)	0
OLIVO														
alcazar 11	O	48,7	2,69	4,38	0			07/02/2014	05/02/1962	03/02/2014	11x5	0	0	ligustrum, Dt farinae, Dt pteronyss, gato, cão
alcazar 12	O	216,9	0,96	0,59	0,04	0	0,06	13/04/2015	21/03/1981	18/02/2015	0	0	0	0
alcazar 14	O	34,5	0,69	0,89					19/07/1962	20/01/2017	4x3	0	0	0
alcazar 16	O	351	13,6	11,8	0,24		0,24	29/08/2014	27/04/1948	22/11/2013	7x4	0	0	0