

Detecção bioquímica dos principais aeroalergénios polínicos da cidade do Funchal

Biochemical detection of the main pollen aeroallergens in Funchal

Data de recepção / Received in: 30/06/2008

Data de aceitação / Accepted for publication in: 21/12/2008

Rev Port Imunoalergologia 2009; 17 (2): 155-173

Irene Câmara

Centro de Estudos da Macaronésia – Universidade da Madeira

Nota / Note: 1.º prémio SPAIC-UCB 2008 / 1st prize SPAIC-UCB award 2008

RESUMO

Fundamento: A optimização das amostras de pólen para análise electroforética constitui uma etapa fundamental na caracterização bioquímica de um extracto, nomeadamente para espécies acerca das quais não se conhecem estudos do ponto de vista alergológico. **Objectivos:** Em consonância com a monitorização aerobiológica realizada na cidade do Funchal entre 2002-2004, pretendeu-se analisar a fracção proteica de extractos de pólen de dez espécies vegetais. A selecção dos extractos baseou-se nos seguintes pressupostos: i) Pertencer a uma família cujo pólen fosse frequente na atmosfera do Funchal; ii) Constituir uma descrição nova na literatura no que concerne à caracterização bioquímica de extractos proteicos. **Resultados:** Obtiveram-se extractos de pólen de plantas acerca das quais não se conheciam estudos desta natureza: *Acacia mearnsii*, *Avena barbata*, *Carduus squarrosus*, *Carlina salicifolia*, *Datura candida*, *Echium nervosum* e *Urtica membranosa*. A análise electroforética revelou a existência de um elevado polimorfismo molecular, como no caso de *U. membranosa*, *D. candida* e *A. Barbata*. O conteúdo proteico de cada extracto de pólen variou entre os 2,15 mg/g de peso fresco de *Pinus pinaster* e os 73,17 mg/g de *A. barbata*. Das dez espécies estudadas, *A. mearnsii* é a planta com menor número de bandas proteicas (9 no total). *D. candida* e *U. membranosa* apresentam 31 bandas, sendo as espécies com maior polimorfismo proteico. **Conclusões:** A ampla difusão destas espécies vegetais e sua proximidade à presença humana requer uma definição do seu carácter alergénico. Tal implica recorrer a extractos de pólen padronizados e avaliar a sua inclusão na bateria *standard* de aeroalergénios epidemiologicamente relevantes para esta região. Neste sentido, este estudo constituiu um contributo na optimização das etapas iniciais de caracterização dos extractos a padronizar.

Palavras-chave: Alergénios, extractos, Funchal, pólen.

ABSTRACT

Background: Obtaining optimum pollen samples for electrophoresis is a key step in the biochemical characterisation of allergen extracts, especially in the cases of species with no prior allergological studies. **Aims:** We sought to analyse the protein fraction of pollen extracts from 10 plant species, in line with the aerobiological screening performed in Funchal, between 2002 and 2004. Extract selection was based on the species belonging to a family whose pollen is frequent in the atmosphere of Funchal and without prior biochemical characterisation. **Results:** Pollen extracts were obtained from previously unstudied plants: *Acacia mearnsii*, *Avena barbata*, *Carduus squarrosus*, *Carlina salicifolia*, *Datura candida*, *Echium nervosum* and *Urtica membranosa*. Electrophoresis revealed high levels of molecular polymorphism, especially in *U. membranosa*, *D. candida* and *A. barbata*. Protein content of each pollen extract ranged from 2.15mg/g of fresh weight of *Pinus pinaster* to 73.17mg/g of *A. barbata*. Among the ten plant species studied, *A. mearnsii* had the lowest number of protein bands (9 in total). *D. candida* and *U. membranosa* had 31 bands and were the species with higher protein polymorphism. **Conclusions:** The broad diffusion of these plant species and their proximity to humans reinforce the importance of determining their allergenic potential. We should consider including standardised pollen extracts of these new plants in the standard aeroallergen battery for this region. This study optimised the initial stages of extract characterisation to be standardised in the near future.

Key-words: Allergens, extracts, Funchal, pollen.

INTRODUÇÃO

Os aerolergénios são moléculas antigénicas que após o contacto com as vias respiratórias, a pele ou as membranas mucosas de indivíduos sensibilizados, são capazes de desencadear reacções imunológicas associadas à IgE. Tal como a maioria dos alergénios, são proteínas ou glicoproteínas de elevada solubilidade e baixa massa molecular (5-100 kDa)¹.

Os ácaros do pó, o pêlo dos animais domésticos e o pólen pertencem ao grupo dos aeroalergénios mais comuns, sendo considerados os principais agentes implicados na sensibilização de indivíduos atópicos^{2,3}.

Os alergénios polínicos não parecem ter uma função biológica que explique a sua alergenicidade, para além da implicada no fenómeno da hidratação e/ou crescimento do tubo polínico. Em alguns casos, demonstrou-se que a sua função bioquímica pode promover condições imunológicas que favorecem a sensibilização⁴. O isolamento e a caracterização dos diferentes alergénios tem permitido definir as

INTRODUCTION

Aeroallergens are antigen molecules, which can trigger IgE-mediated immunological reactions in sensitised individuals after contact with the respiratory tract, skin or mucous membranes. Like the majority of allergens, they are proteins or glycoproteins with high solubility and low molecular weight (5-100 kDa)¹.

House dust mites, animal dander and pollen belong to the most common group of aeroallergens and are considered the main agents involved in the sensitisation of atopic individuals^{2,3}.

Pollen allergens do not seem to have a biological function explaining their allergenicity beyond that implicated in the hydration and/or growth of the pollen tube. In some cases it is shown that their biochemical function can promote immunological conditions which favour sensitivity⁴. Isolating and mapping different allergens has allowed their physico-chemical characteristics to be identified and

suas características físico-químicas e agrupá-los consoante a função biológica e homologia. Os exemplos mais conhecidos são relativos a alergénios com actividade proteásica e proteolítica, bem como profilinas e enolases⁴.

A primeira etapa da caracterização de alergénios envolve a preparação de um extracto do material biológico, cujas soluções utilizadas na extracção proteica são geralmente salinas, como tampão fosfato salino, tampões borato, bicarbonato de amónia e cloreto de sódio. O tempo de extracção varia de algumas horas até 24 horas em agitação magnética. A libertação dos alergénios depende da temperatura e do pH. Normalmente, o processo de extracção decorre a 4°C e a pH ligeiramente básico^{5,6}. O extracto aquoso assim obtido representa uma mistura heterogénea de biomoléculas contendo potenciais alergénios.

Uma complicação frequente nos alergénios estudados é que muitos deles são moléculas polimórficas, isto é, não são constituídos por uma única sequência aminoácida, consistindo em sequências originadas por substituições de aminoácidos numa ou várias posições e que dão lugar a variações nas suas propriedades físico-químicas (massa molecular e ponto isoeléctrico). Estas sequências distintas são designadas isoformas e as suas similitudes expressas em termos de homologia de sequência⁷.

Na caracterização dos alergénios, a electroforese é usada tanto na separação das proteínas que constituem um extracto, como na avaliação do grau de pureza de um alergénio após a purificação. No estudo dos alergénios, é mais frequente a electroforese desnaturante (SDS-PAGE) na presença de dodecil sulfato de sódio, detergente aniónico que complexa com a proteína^{8,9,10}. O isolamento e purificação de proteínas alérgicas deverá não só facilitar a estandardização dos reagentes usados no diagnóstico e tratamento da doença alérgica, mas também promover a segurança e a eficiência de tais reagentes. Este trabalho teve como objectivo analisar a fracção proteica de extractos de pólen, cuja selecção se baseou nos seguintes pressupostos: i) Pertencer a uma família cujos pólenes sejam frequente na atmosfera do Funchal; ii) Constituir uma descrição nova na literatura no que se refere à

grouped according to their biological function and homology. The better-known examples pertain to allergens with protease and proteolytic activity, as well as profilins and enolases⁴.

The first step in characterising allergens involves preparing an extract of biological material in saline solutions, as phosphate-buffered saline, borate-buffers, ammonium bicarbonate or sodium chloride. Extraction time ranges from a few to 24 hours with magnetic stirring. Allergen release depends on temperature and pH. The extraction process usually takes place at 4°C in a slightly basic pH medium^{5,6}. The aqueous extract obtained is a heterogeneous mixture of biomolecules containing potential allergens.

A frequent complication in the studied allergens is that many of them are polymorphic molecules, that is, they do not consist of a single amino acid sequence, but sequences originating from amino acid substitutions in one or more positions. They also have varied physico-chemical properties (molecular weight and isoelectric point). These distinct sequences are known as isoforms and their similarities are expressed in terms of sequence homology⁷.

During allergen characterization, electrophoresis is used to separate proteins in the extract and to evaluate the purity level of an allergen after its purification. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) is a denaturing electrophoresis, frequently used in allergen studies. SDS is an anionic detergent which applies a negative charge to each protein. Isolating and purifying allergenic proteins facilitates both standardization of the reagents used in the diagnosis and treatment of allergic disease and promotes the safety and efficacy of the reagents.

This study aimed to analyze the protein fractions of pollen extracts selected, from species belonging to plant families whose pollen is frequent in the atmosphere of Funchal and for which there was no prior biochemical characterisation. Protein polymorphism

caracterização bioquímica de extractos proteicos. A análise do polimorfismo proteico permitirá inferir sobre o seu potencial alergénico comparativamente ao de outros taxones descritos e taxonomicamente relacionados.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Na realização deste trabalho foi utilizado o pólen de dez espécies de plantas provenientes do Funchal, com excepção das Asteráceas, colhidas em Porto Moniz e Encumeada: *Artemisia argentea* (Asteraceae), *Carduus squarrosus* (Asteraceae), *Carlina salicifolia* var. *salicifolia* (Asteraceae), *Echium nervosum* (Boraginaceae), *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), *Acacia mearnsii* (Fabaceae), *Pinus pinaster* (Pinaceae), *Avena barbata* (Poaceae), *Datura candida* (Solanaceae) e *Urtica membranosa* (Urticaceae).

Do estudo aerobiológico da cidade do Funchal realizado no período 2002-2004, foi possível identificar as famílias mais frequentes no ar e seleccionar as espécies para posterior análise bioquímica.

Optámos por identificar as oito famílias de pólen mais frequentes, a fim de seleccionar uma espécie que apresentasse uma distribuição frequente na cidade do Funchal. No caso das Asteraceae, foram incluídos os géneros *Carduus* e *Carlina* devido ao facto de fazerem parte de uma linha de investigação anterior, relativa à caracterização proteica do pólen de Asteraceae da Madeira. Pela análise bioquímica pretendeu-se estudar a fracção proteica destes extractos, cuja composição não está todavia documentada na literatura.

Tratamento do material

As flores foram colhidas durante a floração. O material foi colocado em estufa a 37°C, durante 24 horas e procedeu-se ao isolamento das anteras maduras e do pólen das partes florais para a extracção das proteínas. Em relação a *E. nervosum* e *D. candida*, com o auxílio de uma lupa, Leica Wild M3, seleccionaram-se as anteras onde havia pólen. Do mes-

analysis allows us to draw inferences on their allergenic potential compared to taxones already mapped and taxonomically related.

MATERIAL AND METHODS

Vegetable material

This study used pollen from 10 plant species from Funchal, except for the Asteraceae which were collected in Porto Moniz and Encumeada: *Artemisia argentea* (Asteraceae), *Carduus squarrosus* (Asteraceae), *Carlina salicifolia* var. *salicifolia* (Asteraceae), *Echium nervosum* (Boraginaceae), *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), *Acacia mearnsii* (Fabaceae), *Pinus pinaster* (Pinaceae), *Avena barbata* (Poaceae), *Datura candida* (Solanaceae) and *Urtica membranosa* (Urticaceae).

From the aerobiological screening performed in Funchal, during 2002-2004, it was possible to identify which plant families had most frequently pollen in the atmosphere of Funchal, and select the species for subsequent biochemical analysis.

We chose to identify the 8 most frequently found pollen families, so as to select species frequent in the atmosphere of Funchal. The Asteraceae genera *Carduus* and *Carlina* were included, as they were part of a former line of research into characterising Asteraceae pollen protein in Madeira. We used biochemical analysis to study the extract's protein fraction from which there was no prior biochemical characterisation.

Treatment of biological material

The flowers were picked during their flowering period. The material was stored in a incubator at 37°C, for 24 hrs, and the mature anthers and pollen from the floral parts were isolated for protein extraction. We used a Leica Wild M3 magnifying glass to select the pollen bearing anthers of *E. nervosum* and *D. candida* and separate the *P. pinaster* pollen sacs. The whole flower

mo modo, se separaram os sacos polínicos de *P. pinaster*. Nas restantes plantas, devido ao reduzido tamanho das peças florais, isolou-se a flor na totalidade. Em seguida, separaram-se manualmente as partes florais utilizando uma rede de malha com 125 µm diâmetro, de forma a reter o material e transferir as anteras e os grãos de pólen para uma caixa de Petri. Confirmou-se o grau de pureza do material separado por observação ao microscópio óptico. As amostras foram conservadas à temperatura de -85°C, para posterior análise.

Extracção das proteínas do pólen

Os extractos de proteínas do pólen foram preparados seguindo o procedimento de extracção de alergénios adoptado pelos laboratórios Alk-Abelló, S.A – Madrid. Pesou-se para um gobelé 0,900 g de material vegetal de *P. pinaster* e 0,200 g para as restantes espécies. A extracção iniciou-se com a homogeneização do pólen numa solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7, numa proporção de 1:10 (p/v), em agitação magnética, durante 90 minutos e à temperatura de 4°C. O pólen de *P. pinaster* esteve em agitação durante 180 minutos. Transferiu-se a suspensão para um tubo, foi a centrifugar a 12 000 g, durante 30 minutos a 4°C (Jouan KR 22i). O sobrenadante foi recolhido com uma pipeta de Pasteur para tubos de ensaio e o sedimento foi eliminado. O sobrenadante foi filtrado em filtros Millipore de tamanho de poro 0,45 µm e armazenado em eppendorfs a -18°C.

Diálise

Procedeu-se à diálise do extracto, antes da filtragem com filtros Millipore, dado verificar-se uma melhor definição dos perfis electroforéticos. A diálise do extracto proteico realizou-se contra o tampão de extracção usando uma membrana de poro 12 a 14 KDa (Medicell International), durante 24 horas a 4°C. O dialisado foi centrifugado a 12000 g, durante 30 minutos à temperatura de 4°C (Jouan KR 22i).

Quantificação proteica

A quantificação proteica total realizou-se segundo o método de Lowry¹¹. Foi elaborada uma recta de calibração

was isolated in the remaining plants due to the reduced size of the floral parts. Next, we manually separated the floral parts using a 125 µm net mesh to retain the material and transfer the anthers and pollen grains to a Petri dish. We used an optical microscope to confirm the purity level of the separated material. The samples were preserved at a temperature of -85°C for posterior analysis.

Pollen protein extraction

The pollen protein extracts were prepared following the allergen extraction procedure adopted from the Alk-Abelló, S.A – Madrid laboratories. We measured 0.900 g of *P. pinaster* vegetable material and 0.200 g of the remaining species into a beaker. Extraction began with the homogenization of the pollen in a 0.1 M, pH 7 phosphate-buffered saline solution at a 1:10 (w/v) proportion in magnetic stirring, for 90 min, at a temperature of 4°C. The *P. pinaster* pollen was stirred for 180 min. The suspension was transferred to a tube and centrifuged at 12000 g for 30 min at 4°C (Jouan KR 22i). The supernatant was collected into test tubes using a Pasteur pipette and the sediment discarded. The supernatant was filtered using 0.45 µm Millipore filters and stored in eppendorfs at -18 °C.

Dialysis

We performed dialysis on the extract before Millipore filter filtering as this gives a sharper definition of the electrophoretic profiles. Protein extract dialysis was performed against the extraction buffer using a 12 – 14 KDa pore membrane (Medicell International) for 24 hrs at 4°C. The dialyzed material was centrifuged at 12000 g, for 30 min, at 4°C (Jouan KR 22i).

Protein assay

Total protein quantification was performed using the Lowry method¹¹. A calibration curve was prepared with a 1.5 mg/ml bovine serum albumin (BSA) solution which

com uma solução de albumina sérica de bovino (BSA) de 1,5 mg/ml, que permitiu a determinação do conteúdo proteico nas amostras. Na construção da recta utilizaram-se os valores médios das absorvâncias de seis duplicados por concentração proteica.

Caracterização molecular

Para determinar o tamanho molecular das proteínas, assim como para comprovar o seu grau de pureza, utilizou-se a técnica SDS-PAGE. Neste trabalho foram utilizados géis de glicina preparados no laboratório. As electroforeses realizaram-se em condições redutoras. Nestas condições adicionou-se à amostra 2-mercaptoetanol a uma concentração final de 5%⁸.

Preparação de extractos

Os extractos foram diluídos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7 (tampão de extracção), na proporção de 1:1 (v/v). Após esta diluição, pipetou-se para um *epENDORF* 40 µl de extracto diluído e 20 µl de tampão de tratamento (12,5% Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8; 10% de glicerol 10%; 20% de SDS 10%; 5% de 2-mercaptoetanol e 2,5% de azul de bromofenol a 5%) Agitou-se a mistura no vórtex e incubou-se num banho termostático à temperatura de 100°C, durante 5 minutos.

Foram utilizados como padrões de massa molecular os marcadores do Kit Low Molecular Weight (Amersham Pharmacia Biotech): fosforilase B (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbónica (31,0 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Adicionou-se 1 µl do Kit a 49 µl de tampão de tratamento, e incubou-se a mistura da mesma forma das amostras, durante 3 minutos.

Electroforese desnaturante (SDS-PAGE)

A electroforese decorreu segundo o método de Laemmli¹², num sistema tampão de pH descontínuo. A preparação do gel foi feita de acordo com Blattle¹³. Assim, o gel de separação foi preparado com a junção de 3,1 ml de água destilada, 2,5 ml de Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, 100 µl de

was used in the determination of the protein content of the samples. Mean absorbency values for 6 duplicates per protein concentration were used to generate the curve.

Molecular characterization

We used the SDS-PAGE technique to determine the molecular size of the proteins and assess their purity level. We used laboratory prepared glycine gels in this study. Electrophoresis were performed under reductive conditions and 2-mercaptoethanol at a final concentration of 5% was added to the sample⁸.

Preparation of extracts

The extracts were diluted in a 1:1 (v/v) 0.1 M, pH 7 phosphate buffer (extraction buffer). After this dilution, 40 µl of the diluted extract and 20 µl of the treatment buffer (12.5% Tris-HCl 0.5 M; pH 6.8; 10% of glycerol 10%; 20% of SDS 10%; 5% of 2-mercaptoethanol and 2.5% of bromophenol blue at 5%) were put into an eppendorf using a pipette. The mixture was agitated in the vortex and incubated in a thermostated water bath at 100 °C for 5 min.

Markers from the Low Molecular Weight Kit (Amersham Pharmacia Biotech) were used as molecular weight patterns: phosphorylase B (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), carbonic anhydrase (31.0 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa) and lysozyme (14.4 kDa). Then, 1 µl of the Kit was added to 49 µl of treatment buffer and the mixture incubated, in the same way as the samples, for 3 min.

Denaturing electrophoresis (SDS-PAGE)

Electrophoresis was performed following the Laemmli method¹² in a discontinuous pH buffer system. The gel was prepared accordingly Blattle¹³; the resolving gel was prepared with 3.1 ml of distilled water, 2.5 ml of Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, 100 µl of SDS 10%, 4.3 ml of polyacrylamide (9.68% acrylamide: 0.26% bis- acryla-

SDS 10%, 4,3 ml de poliacrilamida (9,68% acrilamida: 0,26% bis-acrilamida), 75 µl de persulfato de amónio (PSA) a 30mg/ml e 20 µl de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina). Após agitação, o gel com uma concentração de poliacrilamida de 12,5%, foi adicionado à *sandwich* das placas de vidro, aguardou-se a sua polimerização (aproximadamente 30 minutos). O gel de concentração foi obtido através da junção de 6,1 ml de água destilada, 2,5 ml de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 100 µl de SDS 10%, 1,3 ml de poliacrilamida (9,68% acrilamida: 0,26% bis-acrilamida), 150 µl de PSA a 30 mg/ml e 40 µl de TEMED. Após agitação, o gel, com uma concentração de poliacrilamida de 4%, foi adicionado ao sistema.

Aplicaram-se 15 µl de marcador num poço e 15 µl de extracto incubado nos restantes poços. Para uma melhor visualização da separação electroforética, adicionou-se 20 µl de azul-de-bromofenol a 1% no reservatório do tampão do eléctrodo catódico. Os géis foram montados na tina de electroforese contendo tampão de eléctrodos (9 g de Tris-HCl, 43,2 g de glicina, 3,0 g de SDS e 600 ml de água destilada) e tampão tanque (9 g de Tris-HCl, 43,2 g de glicina e 600 ml de água destilada).

A separação electroforética decorreu no sistema Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad) a uma voltagem constante de 200 V, durante 1 hora e 10 minutos. O aparelho foi mantido numa tina com gelo até à superfície. Os géis foram preparados pelo menos por duas vezes e o erro experimental para cada proteína ou péptido foi inferior a 10%.

Revelação das proteínas

A revelação do gel e a detecção das proteínas foi realizada com nitrato de prata, segundo Blum¹⁴, em agitação constante e à temperatura ambiente. A secagem dos géis decorreu no Gel Air Dryer (Bio-Rad) durante uma hora.

Determinação da massa molecular em SDS-PAGE

Mediante a electroforese foi possível determinar a massa molecular de cada banda diferenciada por densitometria, através do programa informático Photo Capt Mw (Amersham).

mide), 75 µl of ammonium persulfate (PSA) at 30 mg/ml and 20 µl of TEMED (N, N, N', N'- tetramethylenediamine). After agitation, the 12.5% polyacrylamide gel solution was added to the glass plate sandwich for polymerization (approximately 30 min). The stacking gel was obtained by adding 6.1 ml of distilled water, 2.5 ml of Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, 100 µl of SDS 10%, 1.3 ml of polyacrylamide (9.68% acrylamide: 0.26% bis-acrylamide), 150 µl of PSA at 30 mg/ml and 40 µl of TEMED. After agitation, the gel with a 4% polyacrylamide concentration was added to the system.

We used 15 µl of marker in a well and 15 µl of incubated extracts in the remaining wells. For a better visualization of electrophoretic separation, we added 20 µl of bromophenol blue at 1% to the cathode electrode buffer reservoir. The gels were mounted in the electrophoresis tank containing electrode buffer (9 g of Tris-HCl, 43.2 g of glycine, 3 g of SDS and 600 ml of distilled water) and the tank buffer (9 g of Tris-HCl, 43.2 g of glycine and 600 ml of distilled water).

Electrophoretic separation was performed using the Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad) system at a constant 200 V voltage for 1h and 10 mins. The equipment was kept in a tank with ice up to the surface. The gels were prepared at least twice and the experimental error for each protein or peptide was below 10%.

Protein staining

Gel revelation and protein detection was performed using silver nitrate, in line with the Blum¹⁴ method, in constant agitation and at room temperature. The gels were dried in the Gel Air Dryer (Bio-Rad) for 1 hr.

Determining the molecular weight in SDS-PAGE

Electrophoresis allowed the determination of the molecular weight of each band, which were differentiated by densitometry using the IT Photo Capt Mw (Amersham) software.

RESULTADOS

No processo de extracção das proteínas do pólen, a quantidade de material vegetal utilizada foi a mesma para todas as espécies (0,2 g), à excepção de *P. pinaster* (0,9 g), como se pode observar no Quadro 1. A recta de calibração da BSA permitiu determinar o conteúdo proteico de cada extracto. A partir desse valor, fez-se um cálculo da concentração proteica por grama de material fresco.

No Quadro 2 apresenta-se a variação das concentrações proteicas entre as amostras, que varia entre 2,15 a 73,17 mg/g peso fresco. *U. membranosa* e *P. pinaster* apresentam os valores mais baixos, ao contrário de *C. squarrosus*, que surge como a espécie com maior concentração de proteínas no pólen.

Para a obtenção de perfis electroforéticos que permitissem a determinação eficaz da massa molecular das proteínas, fizeram-se diluições seriadas da maioria dos extractos, até à obtenção da quantidade de proteína ideal. Como se pode observar no Quadro 2, e em comparação com o

RESULTS

The amount of vegetal material used in the pollen extraction process was the same for all species (0.2 g) except for *P. pinaster* (0.9 g), as shown in Table 1. The BSA calibration curve allowed the protein content of each extract to be determined. We used this value to calculate the protein concentration per gram of fresh material.

Table 2 shows the protein concentrations among the samples, which ranged from 2.15 to 73.17 mg/g of fresh weight. *U. membranosa* and *P. pinaster* had the lowest values, while *C. squarrosus* was the species with the highest pollen protein concentration.

To obtain electrophoretic profiles which would allow accurate determination of the proteins' molecular weight, we performed successive dilutions of the majority of the extracts until we obtained the ideal amount of protein. As shown in Table 2, and comparing with Table 1, the concentrations of *A. mearnsii* and

Quadro 1. Quantidade de material vegetal utilizada na extracção e conteúdo proteico de cada extracto de pólen

Table 1. Quantity of vegetal material used in the extraction and protein content of each pollen extract

Espécie / Species	Quantidade de material (g) / Quantity of material (g)	Conteúdo de proteína (µg/ml) / Protein content (µg/ml)	Conteúdo de proteína em mg/g peso fresco / Protein content mg/g of fresh weight
<i>Artemisia argentea</i>	0.2	787.00	39.35 ± 0.82
<i>Carduus squarrosus</i>	0.2	1093.10	54.66 ± 1.45
<i>Carlina salicifolia</i>	0.2	670.30	33.50 ± 0.06
<i>Echium nervosum</i>	0.2	202.60	10.13 ± 0.31
<i>Ricinus communis</i>	0.2	635.90	31.80 ± 0.01
<i>Acacia mearnsii</i>	0.2	242.60	12.13 ± 5.98
<i>Pinus pinaster</i>	0.9	193.67	2.15 ± 9.78
<i>Avena barbata</i>	0.2	1463.48	73.17 ± 3.25
<i>Datura candida</i>	0.2	784.80	39.24 ± 1.90
<i>Urtica membranosa</i>	0.2	137.00	6.85 ± 2.04

Quadro 2. Concentração proteica ($\mu\text{g/ml}$) dos extractos após diluição
Table 2. Protein concentration ($\mu\text{g/ml}$) of the pollen extracts after dilution

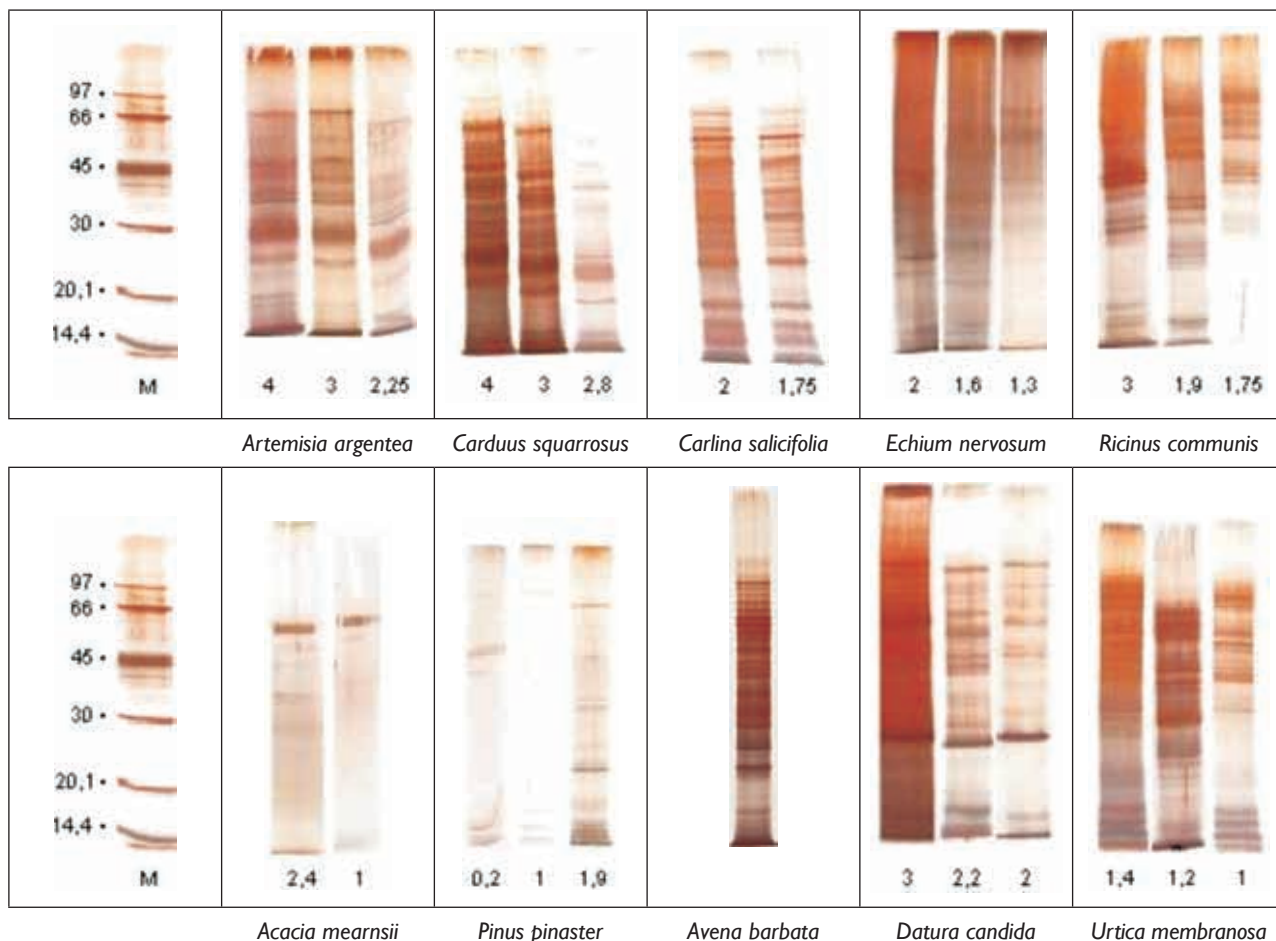
Espécie / Species	Concentração de proteína ($\mu\text{g/ml}$) / Protein concentration ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Artemisia argentea</i>	300
<i>Carduus squarrosus</i>	300
<i>Carlina salicifolia</i>	175
<i>Echium nervosum</i>	160
<i>Ricinus communis</i>	190
<i>Acacia mearnsii</i>	242.60
<i>Pinus pinaster</i>	193.67
<i>Avena barbata</i>	365
<i>Datura candida</i>	220
<i>Urtica membranosa</i>	120

Quadro 1, em *A. mearnsii* e *P. pinaster* as concentrações mantiveram-se. Em relação à *A. mearnsii*, foi preparado somente um extracto proteico, dado que para *P. pinaster* foi necessário realizar três extracções por experiência. Mantendo o volume de solvente (tampão fosfato 0,1 M, pH 7), aumentou-se a quantidade de material vegetal utilizado no processo de extracção, até se obter um extracto com proteína suficiente que permitisse detectar, através de electroforese, as fracções proteicas presentes no pólen.

Na Figura 1 podemos observar os perfis electroforéticos dos extractos dependendo da quantidade de proteína introduzida por poço. Com a excepção de *C. salicifolia*, *A. mearnsii* e *A. barbata*, para cada espécie são apresentados três perfis por extracto, correspondentes a diferentes quantidades de proteína, a proteína ideal (ao centro), e acima ou abaixo desta quantidade. Como havíamos mencionado, realizaram-se três extracções do pólen de *P. pinaster*. Na Figura 1 está documentado o perfil de cada extracto, sendo o terceiro o mais concentrado e o que proporciona uma melhor detecção das bandas. Relativamente aos ensaios efectuados com *A. mearnsii*, somente estão representados dois perfis, o que corresponde à

P. pinaster remained the same. Only one protein extract of *A. mearnsii* was prepared, as we had to prepare three extractions of *P. pinaster* per experiment. While maintaining the volume of the solvent (phosphate buffer 0.1 M, pH 7), the amount of vegetal material used in the extraction process was increased until we obtained an extract with enough protein that allowed detection of the pollen protein fractions using electrophoresis.

Figure 1 displays the extracts' electrophoretic profiles with varying quantities of protein applied per well. With the exception of *C. salicifolia*, *A. mearnsii* and *A. barbata*, three profiles per extract are presented for each species, corresponding to different protein quantities: the ideal protein quantity (in the centre), and above and below this quantity. As stated, we performed three extractions of pollen for *P. pinaster*. Figure 1 shows each extract's profile. The third is the most concentrated and allowed a better detection of bands. Only two profiles are represented for *A. mearnsii*, one corresponding to the ideal quantity and the other representing a lower quantity. The same is true for *C. salicifolia*, but in addition to the sample with the



Legenda / Legend: M – Marcador de massa molecular (kDa) / Molecular weight marker (kDa).

Figura 1. Perfis electroforéticos dos extractos de cada espécie em função da quantidade de proteína (μg) introduzida no poço
Figure 1. Electrophoretic profiles of the extracts of each species in relation to the quantity of protein (μg) applied in the well

quantidade ideal, e o que representa uma quantidade inferior a esta. O mesmo acontece com *C. salicifolia*, mas, além da amostra cuja quantidade é a ideal, é apresentado outro perfil com valor ligeiramente superior.

A massa dos polipéptidos é dada no Quadro 3. Das dez espécies estudadas, *A. mearnsii* é a planta com menor número de bandas proteicas (9 no total). *D. candida* e *U. membranosa* apresentam 31 bandas, sendo as espécies com maior polimorfismo proteico.

Na optimização das técnicas de extracção e electroforética, compararam-se os perfis electroforéticos de

ideal quantity, another profile with a slightly higher value is presented.

The polypeptide weights are shown in Table 3. Of the ten species studied, *A. mearnsii* is the plant with the lowest number of protein bands (9 in total). *D. candida* and *U. membranosa* have 31 bands, making them the species with the highest protein polymorphism. During optimization of the extraction and electrophoresis techniques, we compared the electrophoretic profiles of samples treated with 2-mercaptoethanol against samples treated with thio-

Quadro 3. Massas moleculares (kDa) das proteínas do pólen das espécies estudadas
Table 3. Molecular weights (kDa) of the pollen proteins from the studied species

Número de banda / Number of bands	<i>Artemisia argentea</i>	<i>Carduus squarrosus</i>	<i>Carlina salicifolia</i>	<i>Echium nervosum</i>	<i>Ricinus communis</i>	<i>Acacia mearnsii</i>	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Avena barbata</i>	<i>Datura candida</i>	<i>Urtica membranosa</i>
1	138.33 ± 0.10	150.01 ± 3.24	150.71 ± 2.22	150.01 ± 0.90	144.62 ± 0.92	66.66 ± 4.33	96.59 ± 0.55	111.53 ± 3.56	150.71 ± 0.22	150.71 ± 1.00
2	117.10 ± 1.30	94.30 ± 0.09	101.58 ± 3.46	139.63 ± 7.99	119.08 ± 3.33	64.35 ± 1.22	76.58 ± 3.13	105.72 ± 2.11	129.72 ± 2.10	105.56 ± 0.65
3	78.40 ± 0.34	67.53 ± 0.09	102.11 ± 3.90	115.91 ± 3.89	83.22 ± 0.01	57.27 ± 5.56	42.02 ± 0.33	91.63 ± 0.45	92.83 ± 0.05	96.09 ± 0.41
4	68.37 ± 0.00	56.67 ± 0.13	90.67 ± 4.45	40.54 ± 3.44	70.10 ± 0.73	51.27 ± 0.02	38.61 ± 0.30	84.25 ± 0.01	83.96 ± 0.44	86.18 ± 0.01
5	58.02 ± 2.20	50.43 ± 1.13	85.37 ± 0.06	38.40 ± 0.15	62.43 ± 0.01	47.40 ± 3.20	35.70 ± 6.90	77.26 ± 0.05	76.77 ± 0.23	77.96 ± 0.03
6	53.89 ± 0.30	45.13 ± 2.45	77.02 ± 11.03	33.68 ± 0.23	57.33 ± 0.01	45.84 ± 3.24	31.82 ± 0.09	71.72 ± 0.10	71.52 ± 0.11	73.96 ± 0.34
7	47.98 ± 4.21	43.33 ± 0.02	69.60 ± 2.90	30.27 ± 1.11	55.82 ± 0.00	43.98 ± 0.13	27.45 ± 2.00	63.84 ± 2.89	63.37 ± 0.44	67.74 ± 4.99
8	45.52 ± 0.02	41.46 ± 1.21	61.12 ± 1.89	27.93 ± 0.56	52.92 ± 3.40	42.36 ± 1.89	25.31 ± 1.33	58.36 ± 4.89	62.98 ± 0.13	64.83 ± 2.99
9	42.26 ± 0.03	40.16 ± 0.11	58.87 ± 3.40	25.35 ± 7.89	50.21 ± 0.54	33.04 ± 0.07	24.79 ± 0.45	54.24 ± 3.90	58.92 ± 3.13	62.08 ± 4.55
10	38.90 ± 0.00	36.52 ± 4.81	55.24 ± 0.01	22.35 ± 3.77	45.54 ± 1.13		23.76 ± 4.00	51.82 ± 5.94	55.63 ± 2.99	53.74 ± 5.99
11	36.52 ± 4.10	31.84 ± 2.01	51.74 ± 0.02	21.07 ± 0.00	43.13 ± 0.00		23.03 ± 1.41	49.34 ± 0.02	53.21 ± 0.02	50.03 ± 10.3
12	34.94 ± 0.32	29.83 ± 0.01	46.25 ± 0.90	20.22 ± 0.03	40.40 ± 0.30		19.82 ± 0.00	46.76 ± 2.11	50.87 ± 2.22	45.42 ± 0.00
13	30.09 ± 0.12	25.68 ± 0.89	41.16 ± 0.09	19.70 ± 0.88	38.91 ± 0.91		19.11 ± 0.03	45.71 ± 1.88	47.44 ± 0.01	40.27 ± 9.88
14	26.78 ± 1.10	23.49 ± 0.02	37.15 ± 2.78	17.40 ± 3.44	36.27 ± 0.01		18.14 ± 0.00	44.79 ± 7.88	44.58 ± 0.91	38.02 ± 10.3
15	22.57 ± 0.15	22.26 ± 5.23	34.28 ± 0.01	16.54 ± 4.65	33.12 ± 0.03		17.40 ± 0.77	43.83 ± 2.00	43.50 ± 0.01	36.28 ± 15.1
16	21.81 ± 0.00	21.60 ± 3.22	30.02 ± 3.23		31.60 ± 0.00		16.41 ± 5.89	42.2 ± 3.88	39.94 ± 4.89	33.40 ± 0.32
17	21.38 ± 1.16	20.59 ± 1.90	26.94 ± 6.02		30.44 ± 7.54		15.60 ± 3.01	40.14 ± 4.66	36.50 ± 5.98	30.97 ± 0.21
18	20.75 ± 3.34	17.85 ± 0.00	22.76 ± 2.45		28.74 ± 7.86			37.31 ± 3.60	35.31 ± 3.77	29.17 ± 0.65
19	18.12 ± 2.27	16.42 ± 3.56	20.89 ± 0.34		27.29 ± 6.14			33.35 ± 0.09	32.68 ± 4.14	27.72 ± 0.58
20	12.59 ± 0.01	14.86 ± 0.00	19.39 ± 4.45		26.70 ± 7.00			31.64 ± 0.00	31.64 ± 7.00	25.42 ± 2.83
21		13.63 ± 2.66	15.79 ± 2.89		24.59 ± 5.01			29.61 ± 0.23	29.78 ± 0.01	24.19 ± 3.99
22		11.30 ± 4.78	14.83 ± 0.03					28.57 ± 0.44	28.97 ± 0.02	22.88 ± 4.78
23			13.77 ± 1.08					27.32 ± 4.00	27.11 ± 0.04	21.98 ± 9.00
24								21.74 ± 2.01	25.35 ± 3.35	20.99 ± 6.03
25								20.1 ± 0.01	22.27 ± 4.16	20.16 ± 6.74
26								18.13 ± 0.10	20.81 ± 2.25	19.08 ± 12.9
27									19.89 ± 2.00	17.36 ± 4.62
28									18.40 ± 0.81	16.55 ± 3.12
29									17.51 ± 1.88	15.50 ± 13.3
30									17.03 ± 0.44	13.45 ± 0.37
31									14.69 ± 0.31	12.34 ± 0.01

amostras tratadas com 2-mercaptoetanol e de amostras tratadas com tioglicol, não tendo sido detectadas diferenças entre os dois perfis.

DISCUSSÃO

O procedimento de extracção proteica

Neste trabalho adoptou-se um procedimento de extracção que recomenda 90 minutos de agitação magnética. *P. pinaster* foi a única espécie em que houve necessidade de aumentar este tempo, bem como a quantidade de material vegetal usado na preparação do extracto. O aumento do tempo de agitação para 180 minutos e a quantidade de material para 0,9 g permitiu a visualização das proteínas extraídas. Contudo, está documentado que *Pinus* tem um baixo conteúdo proteico, o que corrobora os resultados obtidos¹⁵. Num estudo realizado com três espécies de coníferas, verificou-se que quanto maior o tempo de extracção, mais proteínas com diferentes massas ocorrem no extracto. Verificou-se ainda, na preparação de extractos de pólen, que o tempo de extracção nunca é inferior a 60 minutos^{15,16,17}.

A eluição proteica

Estudos com *Pinus* sp. revelaram a existência de indivíduos com reacção positiva ao seu pólen; contudo, este continua a não ser considerado importante do ponto de vista clínico¹⁵. De acordo com esses autores, há estudos que demonstram que os alergénios de várias plantas são libertados do grão de pólen rapidamente e em grandes quantidades. Esta rápida eluição dos alergénios e o facto dos sintomas de rinite aparecerem em segundos a minutos após um teste de provocação nasal sugerem que, em condições naturais, a libertação de alergénios também ocorre rapidamente⁵. As partículas aerobiológicas são removidas da nasofaringe em 5-10 minutos e permanecem na laringe cerca de 20 minutos antes de entrarem no tracto gastrointestinal. Por esta razão, a rápida libertação dos alergénios é um factor importante na reacção alérgica¹⁵. Contudo, há proteínas que se libertam mais rapidamente do que outras. Esta

glycol, and no differences were detected between the two profiles.

DISCUSSION

Protein extraction procedure

We used an extraction procedure that recommended 90 min of magnetic stirring. *P. pinaster* was the only species needing an increase of time and amount of vegetal material used in the preparation of the extract. The increased stirring time was 180 min and the amount of material was 0.9 g, which allowed the detection of extracted proteins. However, *Pinus* has been documented as having a low protein content¹⁵, in line with the results we obtained. In a study with three species of conifers, it was seen that the longer the extraction time, the more proteins of different weights occurred in the extract. When preparing pollen extracts, the extraction time was never less than 60 min^{15,16,17}.

Protein elution

Studies with *Pinus* sp. showed that although there are individuals with a positive reaction to its pollen, this is still considered clinically unimportant¹⁵. These authors stated that there are studies showing various plant allergens which are released from pollen grains quickly and in large amounts. This swift elution of allergens and the fact that rhinitis symptoms appear within seconds to minutes of a nasal challenge test suggest that there is a rapid release of allergens in nature too⁵. Aerobiological particles are removed from the nasopharynx in 5-10 min and remain in the larynx for about 20 min before entering the gastrointestinal tract. Accordingly, rapid release of allergens is an important factor in allergic reactions¹⁵. There are, however, proteins which release faster than others. This difference is related to the location of the protein

diferença está relacionada com a localização da proteína no grão de pólen. Os alergénios podem ocorrer no citoplasma do grão de pólen, ou na parede interna ou externa do mesmo, na intina e exina, respectivamente. A condição fisiológica da planta e a função biológica dos alergénios pode determinar a sua presença ou ausência, no grão de pólen, bem como a ocorrência de determinados alergénios num dado momento⁵.

Optimização de etapas da caracterização molecular

A separação electroforética permite determinar o número de proteínas presentes num extracto e identificar o alergénio tendo em conta a sua massa molecular. Com excepção de *A. mearnsii* e *P. pinaster*, houve necessidade de proceder à diluição do extracto inicial das outras espécies, tornando possível a visualização nítida da maioria das fracções proteicas. Como se pode observar na Figura 1, foi possível obter padrões electroforéticos definidos. No entanto, no electroforegrama de *E. nervosum* visualiza-se bastante arrastamento (*background*). Na tentativa de o eliminar, o extracto foi filtrado uma segunda vez. Contudo, este procedimento não resultou da mesma forma que para *A. mearnsii*, em que se melhorou substancialmente a visualização das proteínas do pólen deste extracto, após filtragem.

Polimorfismo proteico

Quanto ao polimorfismo proteico das espécies estudadas, só é possível comparar com dados bibliográficos os resultados obtidos de *R. communis*. À excepção de *Pinus pinaster*, não foram encontradas referências que abordem a caracterização bioquímica dos extractos das restantes espécies. Bahrman *et al.*¹⁸ efectuaram um estudo da genética de *P. pinaster*, no qual descreveram os padrões proteicos do pólen obtidos com diferentes métodos de extracção.

As características fisicoquímicas da maior parte dos alergénios do pólen de *R. communis* foram descritas por García-González *et al.*¹⁹. Nesse trabalho foi feito um estudo aerobiológico em Málaga, onde se demonstrou a existência de indivíduos com alergia respiratória a este pólen. Foram descritas 22 bandas com massas moleculares entre 88 e 13 kDa

in the pollen grain. Allergens can occur in the pollen grain cytoplasm or in its inner or outer wall, intine and exine respectively. The plant's physiological condition and the allergen's biological function can determine their presence or absence in the pollen grain as well as the occurrence of specific allergens at a given moment⁵.

Optimising the molecular characterisation steps

Electrophoretic separation allows the number of proteins in an extract to be counted and the allergen to be identified via its molecular weight. It was necessary to dilute the initial extract in all species except for *A. mearnsii* and *P. pinaster*, for a clear visualization of the majority of protein fractions. Figure 1 shows defined electrophoretic patterns. The *E. nervosum* electroforegram shows a great deal of background particles. The extract was filtered for a second time to try to eliminate them. This procedure did not work as well as for *A. mearnsii* in which we greatly improved the visualization of the pollen proteins in the extract after filtering.

Protein polymorphism

Among the studied species, only the protein polymorphism results of *R. communis* could be compared with published data. With the exception of *Pinus pinaster*, we found no references describing the biochemical characterization of the extracts of the remaining species. Bahrman *et al.*¹⁸ made a study about *P. pinaster* genetics in which they described the pollen protein patterns obtained by different extraction methods.

The physico-chemical characteristics of the majority of *R. communis* pollen allergens have been described by García-González *et al.*¹⁹. They made an aerobiological study, in Malaga, which demonstrated that there are individuals with respiratory allergy to this pollen. Twenty-two bands with molecular weights ranging from 88 to 13 kDa and isoelectric points ranging from 6.8 to 4.0

e pontos isoeléctricos a variar entre 6,8 e 4,0. No presente trabalho foram contabilizadas 21 bandas proteicas com massas a variar entre $144,62 \pm 0,92$ e $24,59 \pm 5,01$ kDa. Um dado a ter em conta neste tipo de estudos é o da heterogeneidade de massa de uma proteína, que pode ser atribuída ao polimorfismo na sequência ou a modificações pós-traducionais, ambas características comuns nos alergénios²⁰.

Asteraceae

As Asteráceas têm um papel importante na sensibilização alérgica. *Ambrosia*, *Xanthium* e *Artemisia* são os três géneros de maior relevância. *Ambrosia artemisifolia* e *A. trifida* são responsáveis por mais de metade dos casos de rinite alérgica sazonal nos Estados Unidos. *Artemisia vulgaris* constitui uma das principais causas de reacções alérgicas no final do Verão na Europa e constitui o arbusto predominante do NE, WE e E europeu¹⁶. Foram isolados quatro alergénios nesta espécie, sendo os dois primeiros, os alergénios *Art v 1* e *Art v 2*, com uma massa molecular de 60 kDa e 35 kDa, respectivamente^{1,16}. No entanto, a informação disponível é discordante quanto à massa molecular de *Art v 1*, cuja identidade bioquímica corresponde à de uma proteína de defesa²¹. Segundo Nilsen¹⁶, a análise em SDS-PAGE revela um alergénio de 60 kDa. De acordo com Clavero²², a massa molecular de *Art v 1* oscila entre 27 e 29 kDa. Em relação a *Art v 2*, os valores são mais semelhantes. Para Nilsen¹⁶, o alergénio tem cerca de 35 kDa e para Clavero²² a massa molecular varia entre 34-38 kDa²³. Por seu turno, *Art v 3* representa uma proteína de transferência de lípidos e *Art v 4* uma profilina, com 12 kDa e 14 kDa, respectivamente²⁴. O estudo da composição proteica da parede polínica de *A. argentea* por PAGE e SDS-PAGE revelou a presença de duas proteínas de 14,5 e 15,5 kDa, para além de outras, com massas a variar entre os 89,1 e os 94 kDa.

A extracção e a separação cromatográfica por exclusão molecular confirmou a presença destas proteínas, detectando-se outras três de 17, 41,6 e 66 kDa²⁴.

C. squarrosus tem uma polinização do tipo zooidófila e, provavelmente, o número de indivíduos sensibilizados aos alergénios deste pólen é muito reduzido. Segundo Behrendt⁶, a fonte

were described. Our study counted 21 protein bands with weights ranging from 144.62 ± 0.92 and 24.59 ± 5.01 kDa. A detail to bear in mind in this type of study is the heterogeneity of the weight of a protein, which could be attributed to the polymorphism in a sequence or to the post-translational modifications, both common features in allergens²⁰.

Asteraceae

Asteraceae play an important role in allergic sensitisation. *Ambrosia*, *Xanthium* and *Artemisia* are the 3 most important genera. *Ambrosia artemisifolia* and *A. trifida* are responsible for over half the cases of seasonal allergic rhinitis in the USA. *Artemisia vulgaris* is a leading cause of late summer allergic reactions in Europe and is a predominant shrub throughout NE, WE and E Europe¹⁶. Four allergens have been isolated in this species. The first two were the allergens *Art v 1* and *Art v 2*, with molecular weights of 60 kDa and 35 kDa, respectively^{1,16}. However, the available data on the molecular weight of *Art v 1* is controversial. Its biochemical identity is that of a defense protein²¹. Nilsen¹⁶ states that SDS-PAGE analysis reveals an allergen of 60 kDa, whereas Clavero²² maintains that the molecular weight of *Art v 1* ranges from 27 and 29 kDa. As for *Art v 2*, the values are similar. Nilsen¹⁶ describes the allergen as having around 35 kDa and Clavero²² states that the molecular weight varies from 34 to 38 kDa²³. In its turn, *Art v 3* is a lipid transfer protein and *Art v 4* a profilin, with 12 kDa and 14 kDa, respectively²⁴. PAGE and SDS-PAGE study of the pollen wall protein composition in *A. argentea* revealed the presence of two proteins with 14.5 and 15.5 kDa, in addition to others with weights ranging from 89.1 and 94 kDa.

Chromatography extraction and separation by molecular exclusion confirmed the presence of these proteins, detecting another three with 17, 41.6 and 66 kDa²⁴.

C. squarrosus has zooidal type pollination and the number of individuals sensitized to this pollen's allergens is probably quite small. Behrendt⁶ believes that the most

de alergénios com maior importância no meio ambiente é o pólen das plantas anemófilas. Tal como em *A. argentea*, constatou-se a existência de um polimorfismo molecular específico da fracção proteica da parede polínica de *C. squarrosus* e *Carlina* sp²⁵. Comparativamente a outras *Cynareae* endémicas, *C. squarrosus* apresenta valores médios de conteúdo proteico na parede polínica. Para além da composição bioquímica do grão de pólen, a disposição da camada de *pollenkitt*-trifina e a presença de um sistema de espinhos e de *caveae* bem desenvolvidos reforçam o carácter zooidófilo desta espécie²⁶. Todavia, a alergenicidade de *Carduus squarrosus* não está ainda documentada.

R. communis (Euphorbiaceae)

Segundo García-González et al.¹⁹, são poucos os estudos acerca da alergenicidade do pólen de *R. communis*. Os trabalhos existentes focam sobretudo a reactividade cruzada entre alergénios de diferentes partes da planta (semente, folhas, pólen), ou a reactividade cruzada com alergénios do pólen de outras espécies. Estes investigadores identificaram por *immunoblotting* treze bandas com massas moleculares entre 67 e 14,5 kDa. Trata-se de uma planta muito frequente na Madeira, e como tal seria interessante investigar, para esta população, a prevalência de sensibilização a este pólen.

A. mearnsii (Fabaceae)

Moreno-Escobosa et al.²⁷ descreveram um caso de rinite e asma ocupacional devido ao pólen de acácia. O mecanismo responsável pelos sintomas era mediado pela IgE, demonstrado mediante teste em *prick* e determinação da IgE específica. A SDS-PAGE demonstrou a existência de bandas proteicas de 35 e 55 kDa, bem como de baixa massa molecular (16, 18 e 20 kDa), cuja reactividade para com a IgE importa investigar.

À semelhança de *R. communis*, *A. mearnsii* apresenta uma distribuição muito frequente na Madeira, nomeadamente na cidade do Funchal.

P. pinaster (Pinaceae)

Vários estudos aerobiológicos efectuados em regiões com áreas de pinhais demonstraram que o pólen de *Pinus* sp. é bas-

significant source of environmental allergens is the pollen from anemophyl plants. As in the case of *A. argentea*, there is a specific molecular polymorphism of the protein fraction of the pollinic wall of *C. squarrosus* and *Carlina* sp²⁵. In comparison with other endemic *Cynareae*, *C. squarrosus* has medium level of pollen wall protein content values. In addition to the biochemical composition of the pollen grain, the disposition of the *pollenkitt*-tryphine layer and the presence of a system of well developed spikes and *caveae* underline the zooidal character of this species²⁶. *Carduus squarrosus* allergenicity is not yet documented.

R. communis (Euphorbiaceae)

According to García-González et al.¹⁹ the studies about the allergenicity of *R. communis* pollen are scarce. The studies which do exist focus mainly on the cross reactivity between different parts of the plant (seed, leaves, pollen) or the cross reactivity with pollen allergens of other species. These researchers used immunoblotting to identify 13 bands with molecular weights ranging from 67 to 14.5 kDa. This plant is commonly found in Madeira, making it interesting to determine the rate of sensitization in the local population.

A. mearnsii (Fabaceae)

Moreno-Escobosa et al.²⁷ described a case of acacia pollen-related occupational rhinitis and asthma. An IgE-mediated mechanism was responsible for symptoms, shown in the skin prick test and serum IgE assay. SDS-PAGE showed 35 to 55 kDa protein bands and low molecular weight bands (16, 18 and 20 kDa), whose reactivity to IgE is worth researching.

Similarly to *R. communis*, *A. mearnsii* is frequently found in Madeira, particularly in Funchal.

P. pinaster (Pinaceae)

Several aerobiology studies undertaken in regions with pinewood areas have shown that *Pinus* sp. pollen

tante abundante na atmosfera. Contudo, as altas concentrações polínicas não significam uma elevada prevalência de alergia a este pólen. De todos os doentes com sintomatologia alérgica que residem nessas zonas, apenas uma pequena percentagem revela sensibilização a *Pinus* sp.²⁸. De acordo com Pettyjohn¹⁵, não é comum o pólen de *Pinus* sp. ser responsável pelo aparecimento de sintomatologia alérgica, apesar de haver vários estudos onde se demonstra que os testes cutâneos realizados com extracto de pólen deste género são positivos. Há várias hipóteses que justificam a sua hipoalergenicidade. Alguns autores consideram que a camada de cera que cobre o pólen, retarda o processamento dos alérgenos. Outros sugerem que o pólen é demasiado grande para entrar nas vias respiratórias, apesar de estar documentada a sua presença no tracto respiratório. Outros investigadores sugerem que o seu baixo conteúdo proteico o torna pouco alérgico. Num trabalho realizado por Pettyjohn¹⁵, a análise comparativa da solubilidade das proteínas do pólen de algumas coníferas revelou que nos primeiros minutos de extração *Pinus echinata* era a espécie que libertava menos alérgenos. Este resultado parece suportar a hipótese de a camada de cera do pólen de *Pinus* sp. estar relacionada com a sua hipoalergenicidade, retardando a libertação dos alérgenos. Hipoteticamente, a presença de elevadas quantidades de esterases e de partículas poluentes poderá induzir uma resposta alérgica²⁹.

D. candida (Solanaceae)

Como foi mencionado, o pólen anemófilo assume um papel importante na sintomatologia alérgica. Porém, há espécies com polinização do tipo entomófilo consideradas alérgicas, como por exemplo *Helianthus annuus* e *Taraxacum* sp. (Asteraceae)²². A exemplo de *Datura* sp., seria interessante proceder à caracterização bioquímica do extracto proteico do pólen de plantas ornamentais, cuja introdução em zonas urbanas tem vindo a aumentar, potenciando o aumento da sensibilização polínica³⁰.

U. membranosa (Urticaceae)

Considerado um tipo polínico com pouca relevância alérgica, contribui em termos percentuais de modo significati-

is abundant in the atmosphere. However, its high pollen count does not mean a high rate of allergy. Of all patients with allergic symptoms residing in these areas, only a small percentage is sensitized to *Pinus* sp.²⁸. Pettyjohn¹⁵ states that it is unusual for *Pinus* sp. pollen to cause allergic symptoms, although several studies show that skin tests to this type of pollen extract are positive. Several hypotheses explain its hypoallergenicity. Some authors believe that the waxy layer covering the pollen slows allergen release. Others suggest that the pollen is too large to enter the human airways, despite documented evidence of its presence in the respiratory tract. Others suggest that its low protein content reduces its allergenicity. In a study by Pettyjohn¹⁵, a comparative analysis of the solubility of pollen proteins from some conifers, showed that at the first minutes of extraction, *Pinus echinata* was the species which released less allergens. This seems to support the hypothesis that the waxy layer of the *Pinus* sp. pollen is related to its hypoallergenicity, slowing the release of the allergens. Hypothetically, the presence of high quantities of esterase and polluting particles could induce an allergic response²⁹.

D. candida (Solanaceae)

As mentioned above, anemophilous pollen is a leading player in allergic symptoms. Some species whose pollen is disseminated by insects are also considered allergenic like, for instance, *Helianthus annuus* and *Taraxacum* sp. (Asteraceae)²². Like with *Datura* sp., it would be interesting to biochemically characterize the pollen protein extract of ornamental plants that are increasingly introduced into urban areas, heightening the pollen sensitisation³⁰.

U. membranosa (Urticaceae)

Considered a pollinic type with low allergenic relevance, it contributes significantly to the total annual pollen count in a region. Aerobiological analysis in Funchal

vo para o total polínico anual de uma região. Da análise aerobiológica do Funchal, verifica-se uma elevada concentração de pólen de Urticaceae. Foi documentada reactividade cutânea positiva a extratos de pólen de *Urtica dioica* e *U. lyalli* em indivíduos atópicos expostos. Foi igualmente detectada IgE específica a *Urtica* devido à sensibilização ocupacional, para além de induzir frequentemente asma, rinite e conjuntivite alérgica³¹. O facto de este tipo polínico apresentar uma dinâmica de variação aerobiológica que oscila de ano para ano e uma presença contínua na atmosfera, potenciada pela distribuição próxima da presença humana³², constituem, *per se*, razões que justificam uma vigilância aerobiológica constante.

CONCLUSÕES

Foram apuradas três técnicas distintas para a obtenção dos perfis proteicos de extractos de pólen a partir da sua fonte natural. Basearam-se na optimização dos procedimentos de extracção, no desenvolvimento de ensaios de doseamento proteico e na separação electroforética sob condições desnaturantes.

A quantidade de amostra biológica e o tempo implicados no procedimento de extracção resultam importantes na definição da composição do extracto. Igualmente implicado está o processo de eluição dos alergénios, o qual, em condições naturais, constitui um factor importante na reacção alérgica.

Obtiveram-se extractos de pólen de plantas acerca das quais não se conheciam estudos desta natureza: *Acacia mearnsii*, *Avena barbata*, *Carduus squarrosus*, *Carlina salicifolia*, *Datura candida* e *Echium nervosum*.

A análise electroforética revelou a existência de um elevado polimorfismo molecular, como no caso de *U. membranosa*, *D. candida* e *A. barbata*.

A ampla difusão de espécies como *R. communis*, *Urtica spp.* ou *A. mearnsii* e sua proximidade da presença humana, reforçam, por um lado, a importância da vigilância aerobiológica, e por outro lado requerem uma definição do seu carácter alergénico para a população desta região.

showed a high concentration of *Urticaceae* pollen. Positive cross reactivity to *Urtica dioica* and *U. lyalli* pollen extracts in exposed atopic individuals has been documented. Specific IgE to *Urtica* has also been detected due to occupational sensitization, in addition to frequently inducing asthma, rhinitis and allergic conjunctivitis³¹. The aerobiological variability of this pollen from one year to another, and its continuous presence in the atmosphere, potentiated by its distribution close to humans³², are good enough reasons justifying their constant aerobiological monitoring.

CONCLUSIONS

Three distinct techniques for obtaining pollen extracts' protein profiles from their natural source were established, with basis on optimal extraction procedures, the development of protein measurement assays and electrophoretic separation under denaturant conditions.

The quantity of the biological sample and the time spent on the extraction process are important for the definition of the extract's composition. Equally important is the allergen elution process, which, under natural conditions, is an important factor in triggering allergic reactions.

We obtained pollen extracts from plants which have not been previously studied in this way: *Acacia mearnsii*, *Avena barbata*, *Carduus squarrosus*, *Carlina salicifolia*, *Datura candida* and *Echium nervosum*.

Electrophoresis showed high molecular polymorphism, as is the case of *U. membranosa*, *D. candida* and *A. barbata*.

The widespread diffusion of species such as *R. communis*, *Urtica spp.* or *A. mearnsii*, and their proximity to humans reinforce both the importance of aerobiological monitoring, and the requirement of the definition of their allergenic potential for the local population.

Por último, a informação fornecida pela monitorização aerobiológica pode ajudar na selecção de alérgenos no procedimento diagnóstico do doente alérgico. Tendo em conta a crescente exposição de novas fontes alérgicas e a necessidade de recorrer a extractos padronizados, importa incluir na bateria *standard* de aeroalérgenos para testes cutâneos novos extractos epidemiologicamente relevantes para esta região. Tal será particularmente útil, por exemplo, no acompanhamento dos doentes com manifestações clínicas sazonais.

Declaração de potenciais conflitos de interesse: Nenhum declarado.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho tornou-se possível graças ao apoio e colaboração de várias pessoas e entidades, nomeadamente: AEMM – Associação para o Desenvolvimento de Estudos Médicos da Madeira, Dr. César Pestana (Instituto de Climatologia e Meteorologia do Funchal,) Dr. Fernando Drummond Borges e Dr.^a Rita Câmara (Unidade de Imunoalergologia do Hospital Central do Funchal), Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade da Madeira, Doutor Domingo Barber e Doutor Florentino Polo (ALK-Abelló, Madrid). Expresso um agradecimento especial aos Doutores Miguel Ângelo Carvalho (Departamento de Biologia da Universidade da Madeira) e Rui Brandão (Departamento de Biologia da Universidade de Évora), pelas valiosas críticas e sugestões.

REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. López FM. Alergia respiratoria en la infancia y adolescencia. 2.^a ed. Barcelona: Springer – Verlag Ibérica; 1999.
2. Johansson S, Hourihane J, Bousquet J, Brujinzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy. *Allergy* 2001;56:813-24.
3. Arshad SH. *Allergy—An illustrated colour text*. London: Churchill Livingstone; 2002.
4. Freile MBC. Caracterización Molecular e Inmunoquímica del Alergeno Principal del Polen de *Plantago lanceolata*, Pla I I. Aplicación a la estandarización de extractos alérgicos. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid – 2001.
5. Carnés J, Fernández-Caldas E, Boluda L, Casanovas M, Sastre J, Bernál M, et al. Rapid release of Ole e I from olive pollen using different solvents. *Allergy* 2002;57:798-804.

Finally, information gleaned via aerobiological monitoring can help selecting allergens for the diagnostic process of allergic patients. Considering the growing exposure to new allergenic sources and the need for standardized extracts, new epidemiologically relevant extracts should be included in the standard battery of aeroallergens used for skin tests in that region. This would be particularly useful, for instance, in monitoring patients who manifest seasonal clinical symptoms.

Potential conflicts of interest disclosure: None declared.

Correspondência / Correspondence to:

Irene Câmara

Centro de Estudos da Macaronésia – Universidade da Madeira

Campus da Penteada, 9000-390

Funchal, Portugal

camire@uma.pt

6. Behrendt H, Becker W.-M. Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. *Curr Opin Immunol* 2001;13:709-15.
7. Thomas WR, Smith W-A, Hales BJ. Allergen-sequence diversity and T-cell recognition. *ACI News* 1998;10:16-22.
8. Hames BD. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames, BD Rickwood D (Eds.). *Gel electrophoresis of proteins – A practical approach*. Oxford: IRL press; 1981:1-91.
9. Díez de Celis C. Electroforesis. In: Arderiu XF, Lacambra MJC, Compañó JMQ (Eds.). *Bioquímica Clínica y Patología Molecular*. 2.ª ed. Barcelona: Editorial Reverte; 1998:169-180.
10. Simões de Carvalho G. *Imunologia Aplicada*. In: Lima N, Mota M (Eds.). *Biotechnology. Fundamentos e Aplicações*. 1.ª ed. Lisboa: Lidel – Edições Técnicas, Lda; 2003:83-105.
11. Lowry OH, Rosebourg NJ, Farr AF, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;139:265-75.
12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
13. Blattler DP, Bradley A, Vanslykek K, Garner F. Quantitative electrophoresis in polyacrylamide gels of 2–40 percent. *J Chromatogr* 1972;64(Suppl 1):S147-52.
14. Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987; 8:93-9.
15. Pettyjohn ME, Levetin EA. A comparative biochemical study of conifer pollen allergens. *Aerobiologia* 1997;13:259-67.
16. Nielsen BM, Paulsen BS. Isolation and characterization of a glycoprotein allergen, Art v II, from pollen of mugwort (*Artemisia vulgaris* L.). *Mol Immunol* 1990;27 (Suppl 10):S1047-56.
17. Sánchez JC, Iraola VM, Sastre J, Florido F, Boluda L, Fernández-Caldas E. Allergenicity and immunochemical characterization of six varieties of *Olea europaea*. *Allergy* 2002;57:313-18.
18. Bahrman N, Plomion C, Petit RJ, Kremer A. Contribution of two-dimensional electrophoresis of proteins to maritime pine genetics. *Ann Sci For* 1997;54:225-36.
19. García-González JJ, Bartolomé-Zavala B, Trigo-Pérez MM, Barceló-Muñoz JM, Fernández-Meléndez S, Negro-Carrasco MA, et al. Pollinosis to *Ricinus communis* (castor bean): an aerobiological, clinical and immunochemical study. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:1265-75.
20. Ayuso R, Carreira M, Lombardero M, Duffort O. Isolation by mAb based affinity chromatography of two Par j I isoallergens. Comparison of their physicochemical, immunochemical and allergenic properties. *Mol Immunol* 1993;30:1347-54.
21. Gadermaier G, Dedic A, Obermeyer G, Frank S, Himly M, Ferreira F. Biology of weed pollen allergens. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004;4:391-400.
22. Clavero MG. *Compuestas/Asteráceas*. In: Santiago AV, García AC (Eds.). *Polinosis. Polen y Alergia*. Barcelona: MRA Ed. S.L. Laboratorios Menarini S.A.; 2002:53-68.
23. Todo-Bom A. *Atlas de Imunoalergologia*. 1.ª ed. Algés: Euromédice, Edições Médicas, Lda; 2004.
24. Câmara IG, Pinheiro de Carvalho MAA, Ornelas I. Extraction and molecular characterization of pollen wall proteins of *Asteraceae* species from Madeira's flora. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. Special Issue of 10th Congress of FESPP 1996:S62.
25. Branco MIJ, Suzete F, Câmara IG, Pinheiro de Carvalho MAA, dos Santos TMM. Identification of pollen wall specific proteins in some Madeira endemic *Cynarae* species. In: Pinheiro de Carvalho MAA, Costa G, Abreu JJ, Rodrigues DM (Eds.). *Proceedings of I symposium of island ecosystems conservation and molecular approach*. Abstract Book. Funchal: University of Madeira, CEM; 2001:167-73.
26. Susete F, Câmara IG, Pinheiro de Carvalho MAA. Palynological characterization of *Carduus squarrosus* (DC.) Lowe. In: Pinheiro de Carvalho MAA, Costa G, Abreu JJ, Rodrigues DM (Eds.). *Proceedings of II Symposium Islands Ecosystems*. Abstract Book. Funchal: University of Madeira, CEM; 2003:37-46.
27. Moreno-Escobosa MC, Rubira N, Ausín A, Amat P, Martínez M, Lluch M, et al. Asma ocupacional por polvo de acacia. *Alergol Inmunol Clin* 2001;16:233-6.
28. García Ortega P, Belmonte J. Pinos. *Pinus*. In: Valero-Santiago AL, Cadahia-García A (Eds.). *Polinosis, Polen y Alergia*. Barcelona: MRA Ediciones; 2002:139-42.
29. Alaimo MG, Li Vigni I, Melati MR. Presence of esterase in *Pinaceae* pollen. *Aerobiologia* 1997;13:117-20.
30. Valero AL, Rosell E, Amat P, Sancho J, Roig J, Piulats J, et al. Hipersensibilidad a polen de *Platanus acerifolia*: detección de las fracciones alergénicas. *Alergol Inmunol Clin* 1999;14(Suppl 4):S220-6.
31. Steinman H, Ruden S. *Weed pollens. Allergy – Which allergens?* Pharmacia Diagnostics AB. Uppsala; 2005.
32. Belmonte J, Canela M, Guàrdia R, Guàrdia RA, Sbai L, Vendrell M, et al. Aerobiological dynamics of the Urticaceae pollen in Spain, 1992-98. *Polen* 1999;10:79-91.