

1. **Barbana V.:** Immunopathologic effect of antigen recognition. *Allergy* (1993); 48: 137-41.
2. **Antonio Arnaiz-Villena:** MHC research: Fast forward. *Immunology Today* (1993); 14:3-5.
3. **William F Wade, Jean Davoust, Jean Salamero, Pascale André, Tania H. Watts & John C Cambier.** Structural compartmentalization of MHC class II signaling. *Immunology Today*. (1993); 14:539-46.
4. **D. Charron:** HLA: An overview. European Science Foundation Workshop "HLA and allergy: family studies" - Sept (1993) *Proceedings*.
5. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference - *Oxford Science Publications* (1991).
6. **Marsh, D.; Shau-Ku Huang:** Molecular genetics of human immune responsiveness to pollen allergens. *Clin. and Exp. Allergy*. (1991); 21 Sup 1: 168-72.
7. **Schevherazade Sadegh-Nasseri & Ronald N. Germain:** How MHC class II molecules work: peptide-dependent completion of protein folding. *Immunology Today*. (1992); 13:43-6.
8. **Charron D. J.** Molecular basis of human leucocyte antigenes classe II disease associations. *Advances in immunol* (1990); 48:107-59.
9. **Svejgaard, A.** HLA and family studies in disease. European Science Foundation Workshop "HLA and allergy: family studies" - Sep. (1993) *Proceedings*.
10. **Clifford M Snapper & James J Mond.:** Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunology Today* (1993); 14:15-17.
11. **Cavaillon J.M.** Citoquinas in allergy. European Science Foundation Workshop "HLA and allergy: family studies" - Sep. (1993) *Proceedings*.
12. **David G. Marsh M N.** Blumenthal Immunogenetic and immunochemical factors determining immune responsiveness to allergens: Studies in unrelated subjects. *Genetic factors in clinical and environmental allergy* (1990): 97-123.
13. **D'Amato, Ruffilli A, Sacerdoti G, Bonini S.,** Parietaria pollinosis: a review. *Allergy*; (1992) 47:443-49.
14. **Corbi, A.L., Pelaez, A., Errigo, E., Carreira J.:** Crossreactivity between *Parietaria judaica* and *officinalis*. *Ann. Allergy* (1985) 54:142-47.
15. **Corbi, A.L., Carreira, J.:** Identification and characterization of *P. judaica* allergens. *Int. Archs Allergy Appl. Immunol.* (1984). 74:318-323.
16. **Feo, D.; Cocchiara, R.; Geraci, D.:** Allergens of *P. judaica* appollen. I. Purification and characterization of a hapten and a low molecular weight allergenic peptide. *Molec. Immunol.* (1984). 21:25-36.
17. **Falagiani, P.; Cavallone, E.; Nali, M.; Rindone, B; Tollari, S.; Crespi, G.:** Aqueous size exclusion analysis of *Parietaria* pollen extracts. *J. Chromat.* (1985). 328:425-31.
18. **Corbi, A.L.; Levy, V.; Sanchez Madrid, F.; Carreira, J.:** Isolation of the major IgE - binding protein from *P. judaica* pollen using monoclonal antibodies. *Molec. Immunol.* (1985). 22:1081-89.
19. **Ford, SA.; Baldo, B.A.; Geraci, G.; Bass, D.:** Identification of *P. judaica* pollen allergens. *Int. Archs Allergy Appl. Immun.* (1986). 29:120-126.
20. **Giuliani, A.; Pini, C.; Bonini, S.; Mucci, N.; Ferroni, L.; Vicari, G.:** Isolation and purification of a major allergen from *P. officinalis* pollen. *Allergy* (1987) 42:434-40.
21. **Bassoli, A.; Chioccaro, F.; Di Gregori, G.; Rindone, B.; Tollari, S.; Falagiani, P.; Riva, G.; Balzacchini, E.:** Analysis of allergenic components of a *P. judaica* pollen extract by chromatographic methods for the evaluation of purification procedures. *J. Chromat.* (1988) 44:209-18.
22. **Bousquet, J.; Hewitt, B.; Guerin, B.; Dhivert, H.; Michel, F.B.:** Allergy in the Mediterranean area. II. Cross-allergenicity among Urticaceae pollens (*Parietaria* and *Urtica*). *Clin. Allergy* (1986) 16:57-64.
23. **Balzacchini, E.; Di Gregorio, G.; Nali, M.; Rindone, B.; Tollari, S.; Falagiani, P.; Riva, G.; Crespi, G.:** Purification and molecular weight studies on the components of a *Parietaria* pollen extract. *Allergy* (1988); 43:53-59.
24. **Ruffilli, A.; Oreste, U.; Santonastaso, V.:** Low molecular weight allergens of *P. officinalis*. *Molec. Immunol.* (1987); 24:305-312.
25. **Ayuso, R.; Polo, F.; Carreira, J.:** Purification of *Par j* I, the major allergen of *Parietaria judaica* Pollen. *Molec. Immunol.* (1988); 25:49-56.
26. **Cocchiara, R.; Locorotondo, G.; Parlato, A.; Guarnotta, G.; Ronchi, S.; Albergiani, G.; Amoroso, S.; Falagiani, P.; Geraci, D.:** Purification of *Par j* I, the major allergen of *Parietaria judaica* pollen. *Int. Archs Allergy Appl. Immun.* (1989); 90:84-90.
27. **Polo, F.; Ayuso, R.; Carreira, J.:** HPLC purification of the main allergen of *Parietaria judaica* pollen. *Molec. Immun.* (1990); 27:151-157.
28. **Oreste, U.; Coscia, M.R.; Scotto D'Abusco, A.; Santonastaso, V.; Ruffilli, A.:** Purification and characterization of *Par o* I, major allergen of *Parietaria officinalis* pollen *Int. Archs Allergy Appl. Immun.* (1991); 16:19-27.
29. **Ayuso R, Carreira J, Lombardero M, Duffort O, Peris A, Basomba A, Polo F.:** Isolation by mAb based affinity chromatography of two *Par j* I isoallergens. Comparison of their physicochemical, immunochemical and allergic properties. *Mol-Immunology* (1993); 30:1347-54.
30. **Menegozzo, M.; Geraci, D.; Ruffilli, A.:** Isolation and characterization of an allergenic fraction from *Parietaria officinalis* pollen. *Immunochemistry*; 13:475-476 (1976).
31. **Geraci, D.; Oreste, U.; Ruffilli, A.:** Isolation and characterization of allergens from *P. officinalis* pollen. *Immunochemistry* 15:491-498 (1978).
32. **Geraci, D.; Billesbolle, K.B.; Cocchiara, R.; Lowenstein, H.; Ipsen, H.:** Immunochemical characterization of antigens in *P. judaica* pollen. Identification of allergens by means of CRIE. *Int. Archs Allergy Appl. Immun.* (1985); 78:421-28.
33. **Polo F, Ayuso R, Carreira J.** Studies on the relationship between structure and IgE ability of *P. judaica* allergen I. *Mol. Immunol.* (1991); 28:169-75.
34. **Costa, MA.; Colombo, P.; Izzo, V.; Kennedy, H.; Venturella, S.; Cocchiara, R.; Mistrello, G.; Falagiani, P.; Geraci, D.:** cDNA cloning, expression and primary structure of *Par j* I, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen. *FEBS Letters* (1994) 341:182-86.
35. **Ruffilli A, Menna T, Coscia MR, Santo M, Scotto d'Abusco A, Oresta U.** Antibody response to the allergens of *Parietaria*: purification and characterization of the major allergen. European Science Foundation. Workshop "HLA and allergy" - May (1993) *Proceedings*.
36. **Martin D. Chapman:** Manipulating allergen genes. *Clin. and Exp. Allergy*. Vol. 21, 155-156 (1991).
37. **Corbi, A.L.; Cortes, C.; Bousquet, J.; Basomba, A.; Cistero, A.; Garcia-Selles, J.; D'Amato, G.; Carreira, J.:** Allergenic cross reactivity among pollens of Urticaceae. *Int. Archs Allergy Appl. Immun.* (1985); 77:377-385.

38. Adolphson, C.; Gleich, G.; Yunginger, J.; Standardization of allergens. *Allergy Cap* 99:652-59.
39. Corbi, AL.; Ayuso, R.; Lombardero, M.; Duffort, O.; Carreira, J.: A competitive solid-phase radioimmunoassay for quantification of the major allergen of *Parietaria* pollen. *J. Immunol. Methods* (1985) 83:83-88
40. Miura M.: Ramie (*Boehmeria nivea*) pollen induced bronchial asthma and allergenic crossreactivity of Ramie and *Parietaria Arerugi*, (1993); 42:649-55.
41. D'Amato, G.; Lobefalo, G.: Allergenic pollen in the Mediterranean area. *J. Allergy Clin Immunol.* (1989). 83:116-122.
42. Charpin, J.; Surinyach. R & Frankland, A. W.: *Atlas Européen des pollens allergisantes* Sandoz Ed., Paris (1974)
43. *Flora Ibérica*. vol. III
44. *Flora Vasculare de Andaluzia Occidental*. Vol. I: 157-8
45. Ortega G.; Cadahia A, Kurdi F, Rodrigo M. Diagnosis of *Parietaria* Pollinosis. *Ann Allergy* (1984); 53:347-49.
46. Kaufman H. *Parietaria*: an unrecognized cause of respiratory allergen in United States. *Ann Allergy* (1990); 64:293-96.
47. D'Amato G.; De Palma R; Verga A; Martucci P; Liccardi G; Lobefalo G. Presence of antigenic activity in non pollen parts (leaves and stems) of allergic plants. *Ann Allergy* (1991); 67:421-4.
48. Miller et al. *Nuc. Ac. Res.* (1988); 16,3:1215.
49. Mullis et Fallona . *Methods Enzymol.* 155:335-350.
50. Saiki et al. *Science.* (1988); 239:487-491.
51. Wood et al. *PNAS-USA.* (1985); 82:1585-1588.
52. Bradford, M.N.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem* (1976); 72:248-254.
53. Mejbaum-Katzenellenbogen, W.; Dobryszycza W.M.: New method for quantitative determination of serum proteins separated by paper electrophoresis. *Clin. Chim. Acta* (1959) 4:515-522.
54. Pires, E.; Madeira, V.: Bargain electrophoresis. *J. Chem Ed.* (1986); 12:1109-1.
55. Weber, K.; Osborn, M.: The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem* 244:4406-4412 (1969).
56. Davies, G.; Stark, G.*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1970) USA 66:651.
57. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J.: Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1980) 76:365-370.
58. Engvall, E.; Jonsson, K.; Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay. *Biochem, Biophys. Acta.* (1971); 251: 427-434.
59. Edge, A.S.B.; Faltynek, C.R. Hof, L.; Reichert Jr. L.E.; Weber, P.: Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Anal. Biochem.* (1981); 118: 131-137.
60. Sibbald, B; Warwick, M. Factors influencing the prevalence of asthma among first degree relatives of extrinsic and intrinsic asthmatics. *Thorax* (1979); 34:332-37.
61. Fergusson, D; Horwood, L; Shannon, F. Parental asthma, parental eczema and asthma and eczema in early childhood. *J. Chronic Dis* (1983); 36:517-24.
63. Cookson, VO; Sharp, PA; Faux, JA; Hopkin, JM; Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* (1989) i; 1292-5.
64. Penny Lympany, Ken Welsh, G. Mac Cockrane, D. Mike Kemeny, Tak Lee. Genetic analysis using DNA polymorphism of the linkage between chromosome 11q13 and atopy and bronchial hiperresponsiveness to methacholine. *J. Allergy Clin Immunol.* (1992); 89; 619-628.
65. Rich, SS; Roitman-Johansson, B.; Greenberg, S.; Roberts, M.; Blumenthal, N.: Genetic analysis of atopy in three large kindreds: no evidence of linkage to D11S97. *Clin. and Exp. Allergy.* (1992); 12:1070-76.
66. Sandford, A.J., T. Shirakawa, W.O., Cookson, J. M. Hopkin et al: Localization of atopy and B subunit of high-affinity IgE receptor (FceRI) on chromosome 11q. *The Lancet* (1993); 341:332-34.
67. Oxelius, VA; Hultquist, C; Husby. Gm Allotypes as indicators of non-atopic and atopic bronchial asthma *Int Arch Allergy Immunol.* (1993); 102:66-71.
68. Cvitanovic, S.; Marusic, M; Juricic, M; Vrdoljak, E; Petroveckii, M.; Rozga, A.; Rucavina, S. Hipersensitivity to *Parietaria officinalis* pollen in newcomers to the area with the plant. *Allergy* (1993); 48:592-97.
69. Chieira, C; Loureiro A; Rodrigues V; Pereira A; Todo-Bom, A.; Canário, D.; Alcobia, C.; Castelhão, C.; Faria, E.; Moreira, M.; Cardoso, S.; Robalo Cordeiro, A.J.A. Estudos epidemiológicos alergológicos numa população de manebos (20 anos). *Via Pneumológica* (1990); 1:67-72.
70. Valenta, R.; Duchene, M.; Vrtala, S.; Birkner, T.; Ebner, C.; Hirschwehr, R.; Breitenbach, M., Rumpold H.; Scheiner, O.; Kraft, D. Recombinant allergens for immunoblot diagnosis of tree-pollen allergy. *Allergy Clin Immunol.* (1991) 88:889-94.
71. Chieira, C.; Todo-Bom, A.; Loureiro, C.; Chieira, L.; Leitão, M.T.; Paiva, J.; Robalo Cordeiro, A.J.A.: Pólens Alérgicos. *Via Pneumológica* (1988); 1:51-57.
72. Ortolani, C.; Pastorello, E.; Incorvais, C.; Ispano, M.; Farioli, L.; Zara, C.; Pravettoni, V.; Zanussi, C. A double-blind, placebo-controlled study of immunotherapy with an alginate-conjugated extract of *Parietaria judaica* in patients with *Parietaria* hay fever. *Allergy* (1994); 49:13-21.
73. European Science Foundation *Workshop* on "HLA and Allergy" - Bautahoj, May. (1993).
74. M. D'Amato, D. Baltadjeva, C. Lahoz, Anna Ruffilli et al. Antibody response to the major pollen allergen from *Parietaria* is associated to defined HLA DrB1* alleles: A survey of Italian, Spanish, Bulgarian and Israel allergic patients. European Science Foundation Workshop "HLA and allergy: family studies" - *proceedings* - September (1993).

H.L.A. e Alergia. Aplicação ao Estudo da Parietária *Lusitânica*

A. TODO-BOM¹, A. MARTINHO², M. J. CORTESÃO³, T. LEITÃO⁴, C. PEREIRA¹, P. SANTOS², O. SIMÕES⁵, J. PAIVA⁴, C. FARO³, H. BRÊDA⁶, C. CHIEIRA⁷, AJA ROBALO CORDEIRO⁸,

RESUMO

A alergia é uma patologia complexa de base imunológica, dependente da intervenção da imunoglobulina E dirigida contra alérgenos múltiplos. A compreensão da doença exige um conhecimento exaustivo de determinantes genéticos e ambientais que a condicionam. As moléculas HLA classe II apresentam selectivamente antígenos a células efectoras, responsáveis pela cascata de modificações inflamatórias que desencadeia a doença. A Parietária é uma Urticaceae com extensa distribuição geográfica e responsável por quadros de polinose em percentagens que variam entre os 10% e 80% dos doentes.

Elegeu-se como objectivo deste trabalho estabelecer associações possíveis entre Fenótipos HLA classe II e alergia a Parietária, conhecendo os factores ambientais de exposição. Procedeu-se à identificação das fracções proteicas da *Parietaria lusitânica* por métodos bioquímicos e imunológicos.

Foi evidenciada carga familiar de atopia em 60% dos casos, constatando-se um início tardio das manifestações clínicas que em 66% envolviam a árvore brônquica. As contagens aeropolinológicas da região revelaram a existência de pólenes de Parietária de Fevereiro a Outubro. Os soros dos

doentes identificaram proteínas alérgicas no extracto de *P. lusitânica*. Existe reactividade cruzada entre antígenos de *P. judaica* e *P. lusitânica*. A análise da distribuição de frequência das especificidades HLA DR permitiu evidenciar, nos doentes, um aumento da especificidade DR11(5), uma diminuição estatisticamente significativa de DR4 e uma tendência negativa do DR3.

Estes resultados, integrados globalmente num estudo mais alargado, envolvendo outros Centros sediados em áreas meridionais europeias, contribuem para a definição de grupos populacionais de risco, orientados para o estudo e esclarecimento dos mecanismos e processos fisiopatológicos, visando, necessariamente, um objectivo final de profilaxia e novas perspectivas selectivas de intervenção terapêutica.

SUMMARY

Allergy is a complex, immunologically-based disease that is dependent on specific IgE antibody to several allergens. The knowledge of genetic and environmental determinants is required to the understanding of this disorder. HLA Class II molecules present antigens to effector cells, responsible for the inflammatory changes that cause the disease. *Parietaria* is an Urticaceae with a large geographic distribution and responsible for pollenosis among 10 e 80% of patients.

The aim of this study was the association between HLA Classe II types and *Parietaria* allergy, regarding the environmental factors. *Parietaria lusitânica* proteins were fractioned by biochemical and immunological methods.

Sensitization among patients' relatives were found in 60%. Bronchial asthma was present in 66% of patients and first complaints occurred in adult age. In our area atmospheric pollens were collected from February to October. The sera identified allergenic proteins in *P. lusitânica* extract. There was cross-reactivity between *P. judaica* and *P. lusitânica*

Unidade de Imuno-Alergologia. Serviço de Pneumologia.
Hospitais da Universidade de Coimbra.
Centro de Histocompatibilidade do Centro.
Instituto de Biologia Celular da Universidade de Coimbra.
Instituto Botânico da Universidade de Coimbra.

1. Assistente Hospitalar de Imuno-Alergologia dos HUC
2. Investigador do Centro de Histocompatibilidade do Centro
3. Investigador do Centro de Biologia Celular da Universidade de Coimbra.
4. Investigador do Instituto Botânico da Universidade de Coimbra.
5. Técnico do Centro de Histocompatibilidade do Centro
6. Director do Centro de Histocompatibilidade do Centro
7. Chefe de Serviço de Imuno-Alergologia dos HUC
8. Director de Serviço de Pneumologia dos HUC

A este trabalho foi atribuído o 1.º lugar do prémio SPAIC - UCB / STALLERGENES 1994 da Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica.

antigens. The analysis of frequency specificities showed an increase of HLA DR11(5), a reduction with statistical significance of DR4 and a decrease of DR3.

These results, integrated in a larger study with european Centers from mediterranean areas, contribute to define risk populations, directed to the study of physiopathologic mechanisms with the purpose of prophylactic and therapeutic approaches.

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da base celular e molecular que regula a resposta imune tem sido uma preocupação permanente nos últimos anos.

1.1 Apresentação Antigénica pelo M.H.C.

(Major Histocompatibility Complex)

O reconhecimento imunológico de antígenos proteicos passa pela sua ligação específica e selectiva a receptores celulares ou solúveis. Com efeito, o processo de reconhecimento antigénico pelo linfócito T (TCR-T Cell Receptor - que se expressa na superfície da membrana celular e aí permanece estável associado ao complexo CD3) com a sua consequente activação pressupõe, genericamente, que este seja apresentado no contexto do complexo major de Histo-compatibilidade-MHC^{1,2}. Basicamente, antígenos intra e extracelulares diferem consideravelmente nas suas formas de processamento e apresentação; enquanto os peptídeos derivados de antígenos intracelulares são apresentados às células T CD8+ por moléculas MHC de classe I, os peptídeos derivados de antígenos extracelulares são apresentados aos linfócitos T CD4+ por moléculas MHC de classe II, habitualmente expressadas por A.P.C. (Antigen Presenting Cells) especializadas. Embora esta dicotomia não seja total e estanque, aceita-se que existem basicamente a via endógena e a exógena de processamento e apresentação antigénica. A interacção específica entre os Linfócitos T e B mediada pelo MHC classe II e o TCR conduz à activação das células B e T, à produção de linfocinas e à diferenciação da célula B em plasmócitos produtores de anticorpos^{3,4}. Esta resposta de intercomunicação é ainda mediada pela interacção de outros ligandos que, além de uma função de adesão, vão desempenhar acções de indução, reforçando o processo de activação génica¹. Será sempre o polimorfismo dos resíduos dos "Sites" antigénicos das moléculas do M.H.C. que irá permitir que uma enorme diversidade de peptídeos possa ser reconhecida pelas moléculas M.H.C.. A classe II permite a ligação de peptídeos de maiores dimensões (entre 15 e 17 aminoácidos) e apresenta heterogeneidade nos terminais N e C, dos domínios distais com variabilidade dos ligandos à cadeia peptídica. Os enclaves do MHC II podem estar abertos em ambas as

extremidades, possibilitando a protusão dos peptídeos nele contidos^{5,6}.

O mecanismo de reconhecimento de antígenos exógenos requiere o seu processamento em endossomas de células apresentadoras, onde sofrem degradação em ambiente ácido e são fragmentados em peptídeos de menores dimensões por acção de proteases⁷. As moléculas de classe II, recentemente sintetizadas, progridem do retículo endoplasmático para o endossoma onde libertam a cadeia invariável de modo a poderem ligar-se aos peptídeos resultantes do processamento do antígeno. O complexo molécula HLA classe II / peptídeo é então transportado para a membrana das A.P.C. para interacção com o receptor específico de antígeno dos linfócitos T CD4+ (TCR). Estes peptídeos vão por sua vez ter um papel crucial na estabilidade das moléculas do MHC⁴. Os produtos dos genes do MHC, ao ligarem selectivamente peptídeos de antígeno processados, vão controlar (restringir) a capacidade de um potencial epitopo ser apresentado ao TCR da célula T (antígeno específico) e, deste modo, controlar o repertório de epitopos a apresentar em cada alérgico.

1.2. Estrutura e organização do M.H.C.

O MHC, complexo HLA (Human Leucocyte Antigen) no homem, está localizado no braço curto do 6.º cromossoma, 45-50 genes, e estende-se ao longo de aproximadamente 3.500 Kbp (quilo pares de bases).

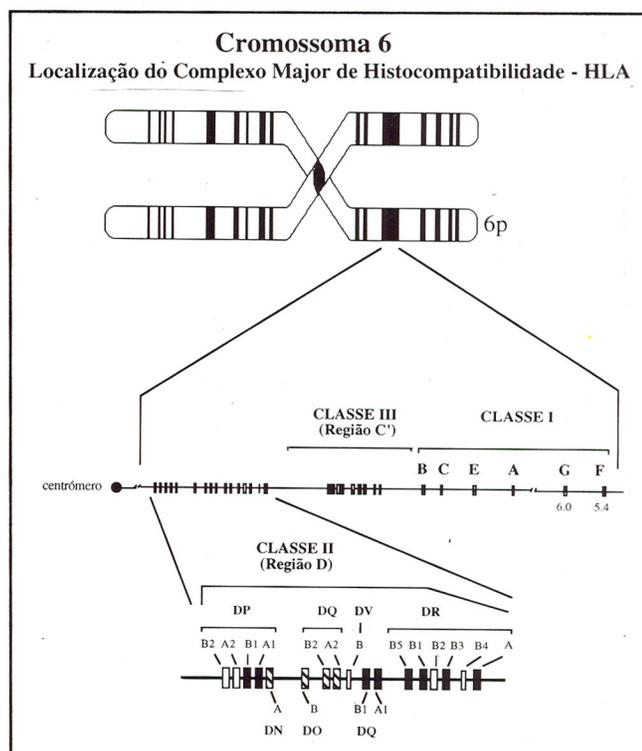


Fig. 1 - Representação esquemática do complexo HLA

Os genes do MHC são agrupados, com base nas características bioquímicas e funções biológicas dos seus produtos, em três classes.

Genes HLA da Classe I: São os que se encontram em posição mais telomérica e estão divididos por três loci "clássicos": HLA A, B, C. Codificam uma glicoproteína transmembranar de 44 KD (cadeia alfa) que está associada não covalentemente à B2 microglobulina (antigénios da classe I). Estes genes são altamente polimórficos, sendo conhecidos, presentemente mais de 96 alelos da classe I.

Para além dos genes clássicos mencionados, pertencem ainda a esta classe os genes HLA E, F, G, e H.

Genes HLA DA CLASS II: Com situação mais centromérica, codificam as moléculas HLA classe II, heterodímeros da membrana celular, compostos por uma cadeia alfa e uma beta, que desempenham um papel crucial na resposta imune a proteínas antigénicas solúveis. Os genes desta região estendem-se ao longo de 1.1 megabases de ADN e estão agrupados em 3 subregiões principais: DP, DQ e DR (ordem relativa ao centrómero).

Subregião HLA DR: É constituída por 6 loci diferentes: 1 locus DRA 1 que codifica a cadeia alfa dos antigénios DR e 5 loci DRB (DRB1, B2, B3, B4 e B5) responsáveis pelas cadeias beta. Enquanto o locus DRA1 não evidencia qualquer grau de polimorfismo, os loci DRB são extremamente polimórficos, em particular o locus DRB1, que codifica as cadeias polipeptídicas beta responsáveis por quase todas as especificidades antigénicas DR. O gene DRB2 é um pseudogene e os alelos dos genes DRB3 e DRB4 codificam, respectivamente, as moléculas DR52 e 53. No locus DRB5, que contribui para a produção de moléculas DR2, já foram encontrados 4 alelos diferentes.

Para a construção de um haplotipo HLA DR (combinação dos genes DR em cada cromossoma) o número de loci DRB pode variar consoante o haplotipo HLA DR, de um (DR8) a quatro (DR4, 7 e 9).

Subregião HLA DQ: É composta por dois pares de loci A e B embora somente os genes DQA1 e DQB1 sejam transcritos. Apesar de não serem conhecidos os produtos dos genes DQA2 e DQB2 parece, todavia, não haver qualquer impedimento génico à sua transcrição. Menos polimórficos que os genes DR, conhecem-se, até ao momento, 11 alelos DQA1 e 16 DQB1. As especificidades serológicas DQ não traduzem, de modo algum, a complexidade deste polimorfismo génico.

Subregião DP: Esta Subregião possui um par de genes codificantes DPA1 e DPB1 e um par de pseudogenes DPA2 e DPB2. Não existindo regiões de hipervariabilidade alélica proeminentes, apresenta, contudo, algum polimorfismo, sobretudo do gene DPB1.

Em suma, podemos afirmar que o polimorfismo evidenciado pelos diferentes loci HLA é devido, não só à multiplicidade de famílias génicas que constituem as várias subregiões (DR, DQ, DP) mas, também, a um forte polialelismo génico que se vai reflectir na sequência aminoacídica dos seus produtos. Este polimorfismo é ainda reforçado pelo facto de os heterodímeros alfa e beta poderem ser codificados pelos respectivos genes A e B quer em posição cis (com ambos os genes no mesmo cromossoma) quer em trans (genes em cromossomas diferentes). Isto aumenta o número de combinações possíveis entre as cadeias proteicas alfa e beta e, conseqüentemente, o polimorfismo das moléculas HLA classe II.

1.3 Associação H.L.A. - Doença

Desequilíbrio de ligação: Uma particularidade do complexo HLA é o facto dos genes serem geralmente herdados em bloco, devido à sua proximidade, para além de desequilíbrios de ligação que se possam estabelecer entre eles. Este desequilíbrio é particularmente importante nas associações HLA e doença.

Para estabelecer um locus de susceptibilidade é necessário estudar grupos étnicos alargados, pois que, algumas combinações génicas podem estar associadas a uma doença apenas em certas populações⁹. Há, ainda, situações em que essa susceptibilidade se encontra associada a um alelo particular, como por exemplo o DRB1*0405 presente em doentes Judeus portadores de Artrite Reumatóide. Noutros casos foi possível determinar haplotipos favorecedores ou protectores (ex. DRB1*1501, DQB1*0602 em diabéticos) de determinada patologia².

A Atopia pressupõe a existência de anticorpos de isotipo IgE dirigidos contra antigénios comuns do ambiente (alergénios). A proliferação do linfócito B e a anticorpogénese depende da "ampliação" - help - fornecida pela célula T CD4+ activada sob restrição M.H.C.. Subtipos de linfócitos T com determinado perfil de secreção de citocinas vão regular o "switch" de isotipo da cadeia pesada de Ig e a expressão de IgE. Doentes atópicos apresentam um elevado número de linfócitos TH2 like, com alta produção de IL4^{10,11}.

A Associação de fenótipos H.L.A. a respondedores e em não respondedores resulta da obrigatoriedade do processamento de peptídeos por células expressando determinadas moléculas de classe II para a sua apresentação específica ao linfócito T¹¹.

Também em patologia alérgica as associações HLA/Doença se fundamentam em estudos alargados, populacionais e familiares, atendendo às características genéticas intrínsecas da população geral onde são efectuados¹².

1.4 Identificação, caracterização e purificação de alérgenos de *Parietária*

Têm vindo a ser efectuadas experiências várias tendo em vista a caracterização dos principais componentes alérgénicos das espécies de *Parietaria* mais conhecidas, a *officinalis* (Po) e a *judaica* (Pj); ambas contêm antigénios e alérgénios reconhecidos por anticorpos IgE e IgG humanos¹³⁻²¹.

Com efeito, ensaios realizados por electroforese em SDS-PAGE revelaram que ambos os extractos apresentavam um padrão electroforético semelhante, particularmente em relação aos polipeptídeos de baixo peso molecular. Para a Pj estão descritos 9 componentes e para a Po 8 componentes que ligam IgE após "immunoblotting" para membrana de nitrocelulose. Ambos os pólenes contêm uma banda de electroforese que situa entre os 10-15 KDa, presentemente reconhecida como o alérgénio major. As outras bandas, menos constantes, migram entre os 18 - 90 KDa e aparecem em cerca de 50% dos doentes. O Po I localiza-se numa banda electroforética de 14,5 KDa²²⁻²⁸. Para o Pj I foram já identificadas e separadas duas isoformas do alérgénio: o isoalérgénio A com um PM de 13 KDa e o isoalérgénio B com um PM de 10,5KDa. Após "immunoblotting" verificou-se que as duas isoformas ligavam a IgE, embora com intensidades diferentes. A análise da sequência aminoácídica revelou a presença de grandes homologias, embora apresentassem algumas diferenças estruturais, nomeadamente uma incompleta reactividade cruzada, confirmada por método competitivo em ELISA. Por testes cutâneos de alergia foi encontrada concordância total entre as duas isoformas²⁹.

A focagem isoelectrica permitiu situar a maior parte das bandas proteicas e os alérgénios major das duas espécies num pH neutro/ácido (pH 4,6 PoI e 5,6 PjI)²⁹⁻³¹.

Por CIE - Crossed Immuno Electroforese e CRIE - Crossed Radio Immuno Eletroforese - foram descritos pelo menos 8 arcos de precipitação que reagem simultaneamente com anti-soro de coelho e com IgE humana para a P *officinalis*. Este método identificou 9 bandas para a P *judaica*^{13,32}.

A grande heterogeneidade descrita para os alérgénios tem limitado o trabalho da sua purificação; esta pode reflectir um "produto" a nível genético com a respectiva variabilidade alélica, isotípica ou mesmo de espécie. Aparentemente, a desglucosilação da glicoproteína reduz essa heterogeneidade, mas sem afectar a antigenicidade, já que os epitopos da Pj I se situam claramente na porção proteica³³.

Com a tecnologia de cDNA obtiveram-se alérgénios recombinantes referidos como membros de famílias de proteínas representadas como o conjunto de isoformas que compõem o alérgénio natural³⁶. Clonaram-se genes específicos para o alérgénio major da Pj e Po. Foi

conseguida uma pequena inserção de cDNA expressando uma proteína de fusão com reactividade cruzada com Po I e com Pj I para anticorpos humano e de coelho^{34,35}. Foi ainda encontrada grande homologia entre a sequência aminoácídica da isoforma A (do extracto nativo) e a proteína de fusão identificada como a Pj I obtida por DNA recombinante²⁹.

1.5 Potência alérgénica e reactividade cruzada entre espécies

Estudos de CIE e de CRIE realizados com extractos de *Parietaria officinalis* e de *Parietaria judaica* com antisoro de coelho imunizado para Pj revelaram para a Pj 2 bandas electroforéticas adicionais, comparativamente aos ensaios realizados com extractos de Po. Os mesmos estudos mostraram em ambos os extractos duas largas bandas de precipitação com baixa mobilidade aniónica, testemunhando antigenicidade cruzada entre proteínas presentes nos dois extractos; estas duas bandas também ligavam IgE de doentes alérgicos a Pj, permitindo concluir que pelo menos estas duas proteínas apresentavam também alérgenicidade cruzada. Na sequência desta experiência, a transferência das proteínas para um extracto de nitrocelulose, revelou outras proteínas com capacidade de ligação IgE, tendo as de maior actividade baixo peso molecular^{22,37}.

A técnica de RAST (Radio Allergo Sorbent Test) *inhibition* realizada com soros de doentes alérgicos à *Parietária* e extractos alérgénicos colocados em fase sólida demonstrou existir uma maior potência alérgénica no pólen de *Parietária judaica* comparativamente ao da *officinalis*^{38,39}. Estes resultados não foram confirmados *in vivo*, por testes cutâneos de alergia, onde o diâmetro da pápula provocada pela Pj não é significativamente superior ao provocado pela Pj (extractos totais).

Relativamente à pesquisa de reactividades cruzadas foram, ainda, desenvolvidos trabalhos com outras espécies da família das urticaceae. Foi demonstrado que proteínas do pólen de urtiga não terão aparentemente propriedades alérgénicas importantes²². Contudo, um trabalho recentemente realizado no Japão, demonstrou que a rami (*boehmeria nivea*), também da família das urticaceae está associada a manifestações de asma brônquica em doentes com IgE específica para o pólen. Estudos de inibição competitiva realizados por ELISA, não revelaram evidência de reactividade cruzada, tratando-se de um alérgénio novo do grupo das Urticaceae⁴⁰.

1.6 Caracterização morfológica e geográfica da planta e do pólen

A *Parietária* é uma erva daninha típica da região Mediterrânica, sendo responsável por quadros de polinose nesta região. Presentemente, estão também documentadas alergias a esta urticaceae no Reino Unido, nos E.U.A. e na Austrália.

Taxonomicamente é uma Urticaceae. As várias espécies existentes incluem a *P. officinalis* L., a *P. judaica* L., a *P. lusitanica* L., a *P. mauritanica* Dur. e a *P. cretica* L., sendo as duas primeiras as mais conhecidas e estudadas⁴¹⁻⁴³, distinguindo-se o tamanho e a folha consoante a espécie em causa⁴³.

Em fitoterapia são-lhe reconhecidas, desde a antiguidade, propriedades medicinais como diurético, cicatrizante e anti-séptico. É utilizada em infusões, para ingestão e banhos e, ainda, em compressas, particularmente em infecções do trato urinário, infecções da pele, queimaduras e traumatismos vários. Em pessoas alérgicas são conhecidas reacções graves na sequência destas administrações, pois que folhas e raízes partilham epitopos ou determinantes antigénicos comuns com os pólenes e podem ser reconhecidos pelos doentes alérgicos à Parietária. A *P. lusitanica*, estende-se até ao Sul e ao Leste europeu, é anual, com um caule escassamente pubescente, multicaule ou ramosa desde a base com os caules filiformes e prostrados. Folhas ovado-romboidais, inflorescências axilares com menos de 5 mm, flores hermafroditas estéreis e escassas, geralmente dispostas na base das inflorescências, enquanto que as femininas se encontram por cima e são férteis. Desenvolve-se preferencialmente em lugares sombrios e húmidos, e apresenta um período fenológico que se estende de Maio a Julho. Pode ser encontrada em Portugal nas regiões de Trás-os-Montes, Minho e Beiras^{42,44}.

1.7 Considerações ambientais

Os grãos de pólen desta planta anemófila são de pequenas dimensões e atingem distâncias apreciáveis quando transportados pelo vento.

Como nem sempre é possível diferenciá-los morfológicamente por observação à microscopia óptica, as contagens destes pólenes aparecem frequentemente referidas como de Urticaceae que inclui também o género urtiga. No sul de Itália, tal como na região de S. Francisco (USA) este pólen pode ser contado de Fevereiro a Dezembro; em Portugal, particularmente analisando os calendários polínicos realizados pelo nosso grupo, encontram-se pólenes na atmosfera de Março a Outubro, de modo semelhante ao que é indicado para o Norte de Itália, sul de França e costa mediterrânica de Espanha; finalmente, nas Ilhas Britânicas o período de polinização estende-se de Junho a Setembro^{13,41,45,46,47}.

A actividade alérgica estende-se a outras partes não polínicas da planta⁴⁸.

1.8 Considerações clínicas

Do ponto de vista clínico e em concordância com o que foi anteriormente referido não existem reacções alérgicas distintas entre as diferentes espécies. Testes cutâneos com as duas espécies mais estudadas e

disponíveis em extractos comerciais (extractos totais) referem a existência de sensibilidade em ambas. A prevalência de sensibilização nesta polinose observa-se nas áreas mediterrânicas do sul de Itália, Espanha e França (40-80%; 10-60% e 25% respectivamente). Em Southampton, 1988, 13% dos doentes com alergia respiratória apresentavam reactividade cutânea a Parietária. Nos Estados Unidos, também em 1988, uma observação sequencial de 100 doentes com alergia sazonal submetidos a estudo de reactividade cutânea, 8% apresentavam testes positivos à Parietária^{13,41,45,46}.

A polinose a Parietária é pouco frequente antes dos 10 anos de idade e afecta, aparentemente, com mais frequência o sexo feminino que o masculino. Queixas de asma brônquica quase sempre associada a rinoconjuntivite aparecem num elevado número de doentes comparativamente ao referido para outras polinoses, determinando, habitualmente, sintomatologia intensa e prolongada.

Assim, estabeleceu-se como **OBJECTIVO** deste trabalho a análise dos aspectos clínicos e laboratoriais desta alergia, e a determinação dos factores genéticos e ambientais que possam condicionar o referido quadro clínico numa área geográfica seleccionada. Deste modo efectuou-se:

1 - Caracterização clínica do doente alérgico à Parietária

2 - Análise de marcadores imunológicos de alergia à Parietária

3 - Tipagem H.L.A. classe II em doentes alérgicos à Parietária

4 - Determinação dos níveis polínicos da Região

5 - Avaliação do potencial de uma Urticaceae, Parietária *lusitanica*, ainda não estudada.

2. METODOLOGIA

2.1 Caracterização clínica do doente alérgico a Parietária

Numa série de 100 doentes alérgicos a Parietária, observados em consulta de imunoalergologia a partir da data em que foi iniciado o trabalho, procedeu-se a uma pormenorizada caracterização clínica.

2.2 Análises de marcadores imunológicos de alergia a Parietária

Todos os doentes foram submetidos a testes cutâneos de alergia aos aeroalergénios comuns (Dome Hollister-Stier), determinação de IgE sérica total e específica orientada pelos resultados obtidos nos testes cutâneos (CAP System-Pharmacia).

2.3 Tipagem H.L.A. classe II em doentes alérgicos a Parietária

2.3.1. POPULAÇÃO

ADN genómico foi extraído de leucócitos do sangue periférico de:

1 - Indivíduos normais, de raça branca, oriundos da região centro e com idades compreendidas entre os 22 e os 60 anos.

2 - Doentes com menos de 35 anos, sem imunoterapia prévia e sem outra patologia crónica concomitante foram submetidos a rigoroso inquérito clínico, incluindo informação relativa a passado étnico de pais e avós, antecedentes patológicos pessoais e familiares (ascendentes até à 2.^a geração e descendentes), exposição ambiental e profissional desde a infância, história actual da doença, factores de agravamento e medicação prescrita. As informações clínicas de todos os doentes foram complementadas com estudo laboratorial e imagiológico.

2.3.2. MATERIAL

- "primers" e oligosondas, segundo sequências acordadas no XI Workshop Internacional de Histocompatibilidade de 1991 (XIth I.H.W./91).

2.3.3. MÉTODOS

2.3.3.1. Isolamento e amplificação do ADN

O ADN foi extraído de leucócitos do sangue periférico segundo o método de Miller et al (salting out).⁴⁹ O grau de pureza e a sua quantificação foram verificados por espectrofotometria de UV (260-280nm). Procedeu-se à amplificação (PCR) dos 2.^o exons dos genes DRB1, utilizando a polimerase do *Thermus Aquaticus* e "primers" (iniciadores de reacção) específicos de cada gene em equipamento Thermocycler 60 da B. Braun^{50,51}. As amostras foram submetidas a 30 ciclos de amplificação, segundo protocolo estabelecido no XIth I.H.W./91, e os seus produtos controlados em gel de agarose 1,5% (agarose tipo II - Sigma)

2.3.3.2. Hibridação com sondas oligonucleotídicas

20% do DNA amplificado foi fixado em filtros de nylon (Hybond N+ - Amersham) usando o Hydri-dot Manifold (BRL) e estes hibridados com oligonucleótidos alelo-específicos marcados pelo 32P (Amersham) ou pela Dig 11 ddUTP (Boehringer Mannheim). Os filtros foram lavados usando uma solução de cloreto de tetrametilamónio 3M (TMAC), que possibilita efectuar as lavagens a uma temperatura independente do conteúdo GC do oligómero marcado⁵¹. Contudo, consoante a reactividade das sondas, foi necessário proceder a ligeiros ajustamentos nas temperaturas de lavagem. Os híbridos foram visualizados por impressão autoradiográfica das amostras durante 30 min. a 1 hora e 16 horas de exposição. Quando as sondas foram marcadas pela Dig

11 ddUTP procedeu-se à excitação das moléculas por um agente quimioluminescente, segundo protocolo fornecido pelo produtor.

Filme 1

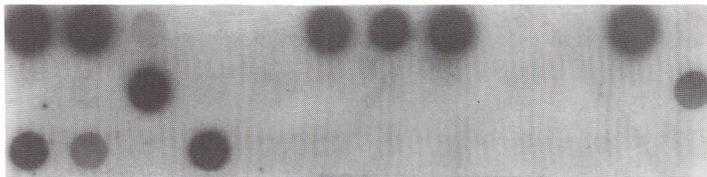


Fig. 3 - Oligotipagem DRB genérico; auto-radiografia de filtros com 36 amostras, após hibridação com SSO 7004 (DR3).

2.3.3.3. Análise estatística

Foi utilizado o teste de qui-quadrado sendo o nível mínimo de significância estabelecido a 0,05.

2.4 Determinação dos níveis polínicos da Região

Procedeu-se a colheita e contagem dos pólenes mais representativos da região com polinómetros volumétricos colocados em vários pontos da cidade para elaboração de calendários polínicos⁴⁷.

2.5 Avaliação do potencial alergénico da *Parietária lusitanica*

Como material biológico foram utilizadas flores congeladas de *Parietaria lusitanica* colhidas no seu ambiente natural. Escolheram-se as flores mais maduras que ainda conservavam o pólen nas suas anteras e a colheita foi executada com a ajuda de uma pinça de forma a evitar qualquer material vegetal para além das flores.

2.5.1. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PARA TESTES CUTÂNEOS

Submeteu-se o pólen a extracção pelo éter em local bem ventilado. Colocaram-se 2,5 gr de pólen em tubo de vidro onde foi misturado com movimentos lentos em 50ml de éter e deixado em repouso durante 30mn até que o pólen foi sedimentado. O sobrenadante foi aspirado e os mesmos passos repetidos mais 3 ou 4 vezes até que o sobrenadante já não conservasse a cor amarela. Então, o pólen foi misturado com 50ml de solução tampão salina fosfatada (NaCl 0.15M, fosfato 0.01M, pH7.2) previamente esterilizado usando um filtro milipore.

O conteúdo proteico foi testado pelo método de Bradford⁵³.

2.5.2. PREPARAÇÃO DO EXTRACTO E DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO.

Para extracção do material congelado, foram maceradas 3g de flores de *P. lusitanica* com a ajuda de uma vareta de vidro e através de um crivo com 125 mm

de malha, adicionando a solução de extracção (NH₄CO₃ 0,125 M, Na₃N 0,05% (p/v), PMSF 5,7x10⁻⁴ M a um pH=8,7) e ainda PVPP para uma prevenção mais eficaz da protólise. Os grãos de pólen passaram através da rede enquanto que os inevitáveis tecidos vegetais que os acompanham (restos de folhas, estames, cálices), ficaram retidos. Esta maceração foi efectuada a uma temperatura de 4°C, que permaneceu também durante as 4 horas de agitação contínua. Após este tempo, o extracto foi centrifugado a 4000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C, para que os grãos de pólen sedimentassem. O sobrenadante contendo os alergénios foi liofilizado e as amostras guardadas a -20°C.

Procedeu-se à análise quantitativa de proteína presente na amostra utilizando uma modificação do método do ácido tânico descrito por Mejsbaum-Katzenellenbogen & Dobryszczyka (1959)⁵⁴.

2.5.3. TÉCNICA DE ELECTROFORESE

Para se efectuar a electroforese em gel de poliácridamida a amostra liofilizada foi solubilizada em 0,2 ml de tampão Tris-Glicina, e de seguida centrifugada durante 10 minutos a 12000 r.p.m.. A 50 ml de sobrenadante adicionou-se um volume igual de solução desnaturante (0.35 mol/l Tris-HCl a pH 6,8 contendo SDS 6% (P/V), b-mercaptoetanol a 10% (v/v) e glicerol a 20% (v/v) e ferveu-se durante cinco minutos sendo em seguida de novo centrifugada.

Foi utilizada uma mistura padrão (Sigma MW-SDS 6) de MW conhecidos: albumina de bovino (66.000 D), albumina do ovo (45.000 D), porcine stomach mucosa pepsin (34.700 D), tripsinogénio do pâncreas de bovino (24.000 D), b-lactoglobulina de leite bovino (18.400 D), egg white lysozyme (14.300 D).

A separação electroforética das proteínas em gel de poliácridamida foi efectuada num sistema (tanques de electroforese + fonte de energia) construído para o efeito de acordo com Pires e Madeira⁵⁵. Esta separação, em função da massa molecular das suas cadeias polipeptídicas, foi efectuada em gel de poliácridamida a 10% na presença de SDS segundo uma modificação do método de Weber e Osborn²³. Utilizou-se ainda um gel de concentração ou "Stacking Gel" que, colocado no topo do gel de separação, facilita a entrada da amostra no gel evitando a precipitação das proteínas e assim favorecendo a sua separação no gel. Ligou-se a fonte a uma intensidade média e deixou-se correr durante várias horas até o bromofenol (corante marcador) presente na mistura padrão se encontrar apenas a 1 cm do limite inferior do gel.

Os gels de poliácridamida foram revelados para detecção de proteína por coloração com C.B.B. - Coomassie Brilliant Blue R a 0,25% (p/v) preparado em metanol a 50% (v/v) e ácido acético glacial a 10% (v/v), seguido de descoloração em metanol a 25% (v/v) e ácido acético glacial a 5% (v/v). Cortou-se uma tira

do gel, utilizada como controlo, contendo uma aplicação da amostra e do padrão e submergiu-se em solução corante durante meia hora aproximadamente, enquanto o resto do gel se destinou ao Western Blotting. Retirou-se o gel da solução corante, lavou-se com água destilada e submergiu-se em solução descorante durante a noite.

Para determinação do peso molecular dos polipeptídeos da amostra utilizou-se uma modificação do método de Weber e Osborn⁵⁶ e de Davies e Stark⁵⁷. Utilizando o peso molecular dos polipeptídeos do padrão e depois de conhecido o gráfico padrão (Rf versus log MW), foi possível, por extrapolação, calcular o peso molecular dos polipeptídeos da amostra.

Para efectuar western blotting seguiu-se o método descrito por Towbin (1979)⁵⁸, que produz cópias perfeitas dos padrões proteicos separadas electroforéticamente em gels de poliácridamida. Logo após a electroforese, os 2 terços restantes do gel foram equilibrados durante 30 minutos em tampão de transferência. (tris 25 mM, glicina 192 mM em 20% (v/v) de metanol a pH 8,3). Em seguida foram cortadas duas folhas de papel de filtro (Whatman 3MM) e uma membrana de nitrocelulose (Schleicher & Shuell BA 85, 0,45 mm) sendo embebidas em água destilada e depois em tampão de transferência.

Foi efectuada a montagem da unidade de transferência (tipo "sandwich") Uma vez colocada a montagem na câmara de transferência (LKB 20005 TRANSPHOR) foi aplicada uma voltagem de 20 v durante aproximadamente 20 horas - "overnight" a 4°C. Concluída a transferência, cortou-se uma tira da membrana de nitrocelulose que inclui amostra e padrão e mergulhou-se durante alguns minutos numa solução corante de amido black (0,1% (p/v) em 10% (v/v) de ácido acético glacial e 45% (v/v) de metanol) para verificar a eficácia da transferência. Descorreu-se primeiro em água destilada e só depois com uma mistura de 90% (v/v) de metanol e 2% (v/v) de ácido acético glacial que reduz significativamente o "background".

2.5.4 REACÇÃO IMUNOLÓGICA

Para detecção imunológica de moléculas seguiu-se essencialmente o método para anticorpos marcados com fosfatase alcalina descrito por Engvall, Johnsson e Perlmann (1971)⁵⁹. Assim, o restante terço da membrana de NC foi colocada a incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente numa solução constituída por 0.5% (v/v) de Tween 20 em PBS (0.15M de NaCl em 0.01M de Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄, pH 7.2) e ainda 0.1% (p/v) de gelatina para bloquear a superfície da membrana de modo a evitar posteriores ligações não específicas. A membrana é lavada brevemente com água destilada e colocada a incubar no antisoro diluído de doentes alérgicos à Parietária em PBS-Tween durante a noite à temperatura ambiente com agitação contínua. Lavou-se várias vezes a membrana de NC e de seguida

incubou-se com anti-IgE humana marcada com fosfatase alcalina (Sigma) diluída em PBS-Tween durante 4 horas à temperatura ambiente com agitação contínua. Terminado o tempo de incubação efectuaram-se de novo as lavagens da membrana com PBS-Tween.

Em seguida, noutro saco de plástico, incubou-se a membrana com 45 ul de NTB e 35ul BCIP em 10 ml de Tris 0,1 M, NaCl 0,1 M (pH=9,5) e MgCl₂ 50 mM, no escuro e sem agitação. Parou-se a reacção com TRIS 10 mM (pH 8,8) e EDTA 1 mM. Utilizou-se procedimento análogo na incubação com antisoro de coelho obtido de animal sensibilizado à *P. judaica* e amavelmente cedido pelo Prof. Correia.

2.5.5 DESGLICOSILAÇÃO

Para desglicosilação das glicoproteínas o hidrato de carbono covalentemente ligado a cadeias polipeptídicas foi removido por tratamento com ácido trifluorometanosulfónico⁶⁰. Para tal, 100-200 mg de glicoproteína liofilizada até à secura completa, foram desglicosiladas por reacção durante 2 horas com 50 ml de TMS: anisole (9:1) num tubo imerso de gelo. A proteína foi precipitada por adição de 1 ml de éter dietílico: piridina (9:1) a -20°. Após centrifugação a 12000g durante 8 minutos, o sedimento foi ressuspendido e dialisado durante a noite contra o mesmo tampão para a remoção do trifluorometanosulfonato de piridina. Em virtude de precipitar durante a diálise, a proteína desglicosilada foi recuperada no sedimento, após centrifugação a 12000g durante 8 minutos.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização clínica do doente alérgico a Parietária com análise de marcadores imunológicos de alergia

O grupo de doentes estudados apresentava uma média de idades de 33.7±9.9 anos (15-59 A), sendo do sexo masculino 47%. O início dos sintomas nestes doentes ocorreu em uma média de idades de 21.8±10.1 anos tendo, alguns deles, iniciado sintomatologia apenas aos 48 A. Foram encontradas manifestações de rinite em 81% dos doentes (isolada em 31%), de asma em 66% e manifestações cutâneas de urticária e/ou eczema em 17%.

Nos testes cutâneos de alergia (prick) o diâmetro médio da histamina foi de 6.1±1.9mm e de Parietária de 8.7±3.2mm. O valor médio de imunoglobulina E sérica total foi de 400±366, tendo sido encontrados valores que variavam de 11 a 1973 UI. A IgE específica a Parietária (CAP System-Pharmacia) apresentava em todos os doentes uma classe superior à classe 3, com um valor médio de 3.4±1.0.

Foi observada alergia isolada a Parietária em 24% dos doentes. Nestes, os primeiros sintomas surgiram em média aos 24.9±8.0 anos de idade e para a IgE sérica total foi encontrado um valor de 292 ± 257 UI. A IgE específica determinada também por CAP System-Pharmacia revelou uma classe média nestes doentes de 3.4±1.1 e um diâmetro médio de pápula a Parietária por prick de 7.8±3.3mm.

Os doentes com sensibilização a ácaros do pó doméstico associada apresentavam sintomas mais precoces (15.4±8.7 anos) e um valor de IgE sérica total mais elevado, de 535±386 UI. Embora estes dados se afastem dos da população referida, o valor médio para o Prick-Test realizado com ácaros foi inferior ao da Parietária (5.0±4.3mm), revelando clinicamente uma marcada exacerbação sazonal.

Os doentes tipados apresentavam uma média de idades de 29.5±5.7 anos, reportando o início dos sintomas aos 20.8±9.3 anos. Do ponto de vista clínico, a rinite foi diagnosticada em 89.7% dos casos, a asma em 68%, a conjuntivite em 30,7% e finalmente os sintomas cutâneos (urticária e/ou eczema) em 13%. Em Prick Test a pápula da histamina apresentava um diâmetro médio de 5,1±1,5 mm e a da Parietária de 8.4±2.4 mm. O valor médio de IgE sérica total foi de 401±328 KU/I e a média encontrada para as classes de IgE específica foi de 3.9±0.7.

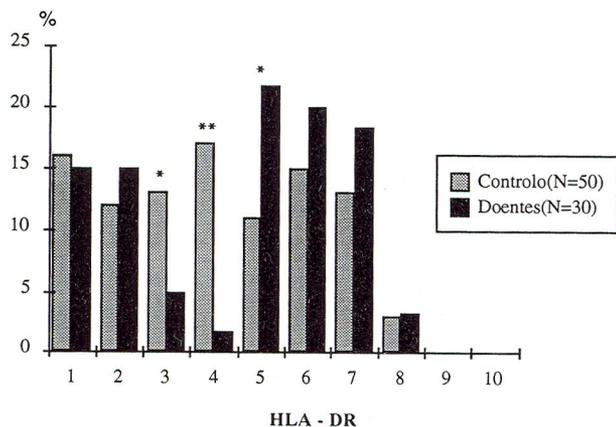
Cerca de um terço dos doentes referia sintomatologia durante um longo período do ano, que se estendia desde a Primavera até ao Outono; 25% situavam o período de sintomatologia dominante à Primavera tardia, enquanto os restantes apresentavam manifestações durante a estação polínica das urticaceae, em combinações variáveis, mais ou menos localizadas, e com algum paralelismo com os picos de incidência aeropalínológica. Cerca de 70% dos doentes estudados habitaram, em períodos significativos da sua vida, em zonas rurais. Nenhum dos doentes referia hábitos tabágicos, mas 50% apresentavam exposição profissional de risco, nomeadamente com actividades profissionais na indústria têxtil e na construção civil. Em antecedentes familiares foram observados estigmas de atopia em 60% dos doentes.

A presença de IgE específica para a *P. officinalis*, *P. judaica* e *P. lusitanica*, avaliada por testes cutâneos (Prick Test) apresentavam os seguintes valores de diâmetro médio; histamina: 5.1±1.5mm; Po: 8.4±1.5 mm; Pj:8.4±1.5 e Pl: 5.2±1.9 mm.

3.3 Tipagem H.L.A. classe II em doentes alérgicos a Parietária

A tipagem HLA-DR obtida com sondas genéricas, foi efectuada em 50 indivíduos normais e 30 alérgicos a Parietária. A análise da distribuição de frequências das especificidades DR (DR1 a DR10) (Gráf. 1),

permitiu confirmar aumentos significativos de DR 11⁵ quando comparadas com as dos indivíduos normais (22% vs 11% respectivamente), verificar as reduções de DR3 e de DR4, esta com significado estatístico, no grupo de alérgicos.



Gráf. 1 - Distribuição de frequências HLA DR entre doentes alérgicos as Parietária lusitânica e controlos

* sem significado estatístico
** p<0.05

3.4 Determinação dos níveis polínicos da região

Observaram-se as seguintes contagens polínicas no período de 1 de Janeiro a 31 de Dezembro de 1993 (Gráf. 2).

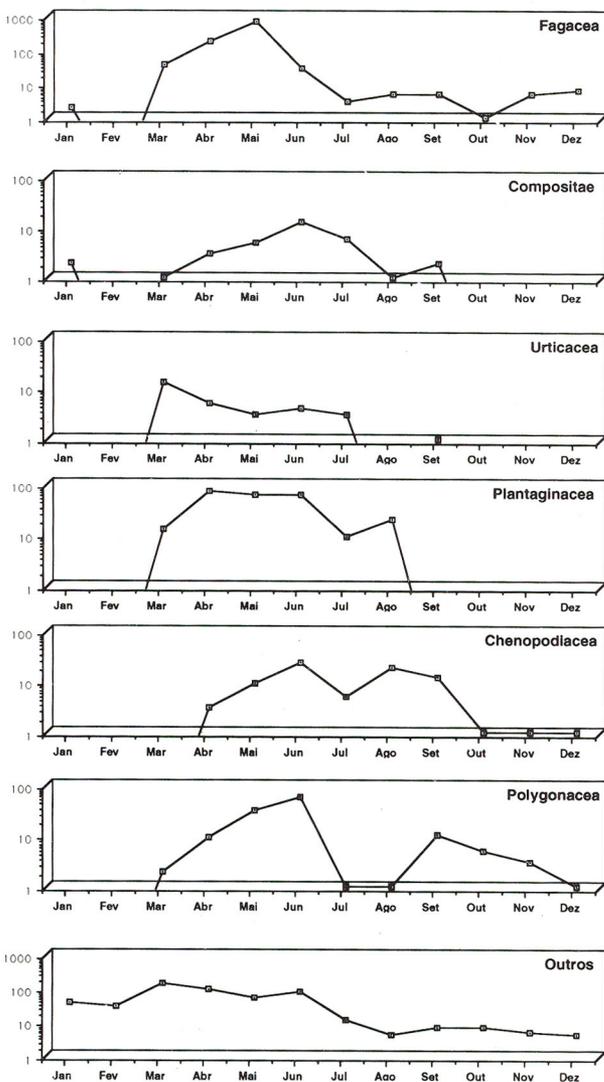
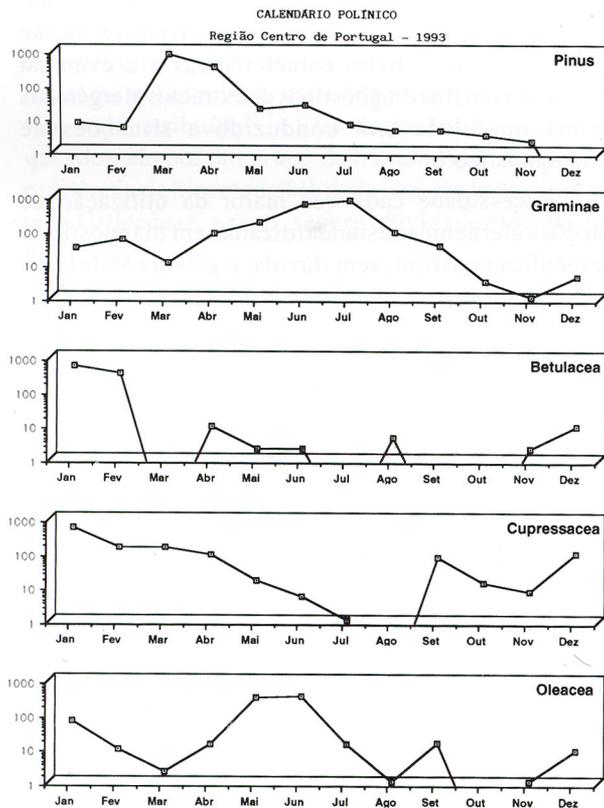
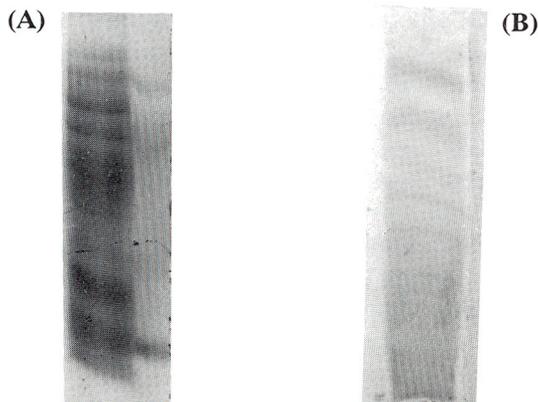


Gráfico 2

4.5 Frações alérgénicas da *Parietária lusitânica*

A electroforese do extracto de pólen de *P. lusitânica*, revela a presença de 10 bandas coradas com CBB (A). Todas as bandas possuem PM que se situa entre 10.000 e 70.000 daltons. O padrão de ligação das proteínas transferidas, por "imunoblotting", à IgE específica dos doentes foi muito heterogéneo. Contudo, das 5 bandas identificadas (B) a situação entre 10-17 KDa foi a mais frequentemente detectada pelos soros testados.



A transferência simultânea de extractos de *Parietária judaica* e *lusitanica* para membranas de N.C. e posterior incubação com IgE humana de doentes alérgicos permitiu evidenciar uma reacção mais intensa no extracto de *P. judaica*, sendo reduzida a reacção de ligação revelada pela *P. lusitanica*. Quando, em paralelo, a mesma experiência foi realizada com transferência dos dois extractos para as respectivas membranas de N.C. e submetidas a posterior incubação realizada também separadamente, ambos revelaram um mesmo padrão electroforético e de ligação IgE ainda que, do mesmo modo fosse mais intensa a ligação às proteínas da *P. judaica*.

Com a adição de antisoro de coelho à membrana de N.C., observou-se uma ligação intensa às bandas separadas por electroforese e reveladas por coloração com "Coomassie Brilliant Blue" em procedimento anterior.

A desglucosilação não provocou diferenças no padrão electroforético em SDS-PAGE nem na capacidade de ligação IgE após transferência para N.C.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A investigação em marcadores genéticos de atopia desenvolveu-se perante evidências indiscutíveis de um carácter hereditário presente nesta patologia e confirmado por estudos epidemiológicos diversos^{61,62}. Os trabalhos de Cookson, que identificou o marcador D11S97 do cromossoma 11 como estando associado a esta síndrome, foram recebidos com algum entusiasmo nos meios científicos⁶³. Outros grupos negaram a existência desta associação noutras populações^{64,65} e mais recentemente têm vindo a ser procuradas associações com genes que codificam factores solúveis e moléculas de adesão, produtos indiscutivelmente implicados no fenómeno alérgico^{66,67}. Fundamental é, também, a intervenção do sistema de H.L.A. no processamento e apresentação de antigénios do meio com consequente activação da cascata inflamatória que desencadeia doença^{1,2,3,4}. Contudo, qualquer análise dirigida para esta associação requer um exacto conhecimento do trinómio população, ambiente e alergénio.

Do ponto de vista clínico há a realçar, no grupo de doentes estudados, um início relativamente tardio dos sintomas que, aliás, se revelou mais acentuado nos doentes que apresentavam polinose isolada à *Parietária*. A asma brônquica esteve presente num elevado número de doentes e as manifestações cutâneas, embora menos frequentes, atingiram valores pouco comuns noutras polinoses. Estes dados estão de acordo com os encontrados por outros autores^{13,41,45,68} que entretanto não avançam qualquer explicação para os longos períodos de sensibilização evidenciados para este pólen. Também noutras séries é destacada a elevada incidência

de asma, na dependência da reduzida dimensão do pólen e da potência alergénica dos seus constituintes proteicos^{13,41,45}. A análise do comportamento de doentes que se deslocaram para áreas onde a incidência aeropalínológica é elevada e sem explicação prévia ao alergénio revelou uma correlação positiva entre o tempo de permanência nestas áreas e os valores de IgE específica, determinados no soro e por testes de hipersensibilidade cutânea. Ao contrário, os autóctones revelaram uma correlação inversa entre a idade, e consequentemente, a duração da doença, e a hipersensibilidade ao pólen de *Parietária*⁶⁸. Esta observação sugere que a polinose, com tradução clínica, resulta de um conjunto progressivo de alterações da imunidade provavelmente constituído após exposição ao alergénio.

Ainda, em relação às alterações imunológicas séricas, observamos valores de IgE sérica total pouco elevados, comparativamente aos nossos valores de referência⁶⁹, situando-se um grande número de doentes dentro de parâmetros normais. Com efeito, está referenciada noutros estudos a existência de concomitância de valores séricos de IgE normais com valores de IgE específica comparativamente elevados. As alterações produzidas por estes alergénios serão, por isso, altamente específicas e dirigidas de modo a eclodirem situações clínicas exuberantes. A sintomatologia que, nalguns casos, tem um carácter sazonal marcado, limitando-se à Primavera quando a incidência aeropalínológica é máxima, pode apresentar uma distribuição quase anual, estendendo-se até ao final do Outono. Estas características e a eventual utilização com fins diagnósticos de extractos alergénicos de má qualidade tem conduzido a situações de subdiagnóstico⁴⁵.

A necessidade cada vez maior da utilização de fracções alergénicas standardizadas em diagnóstico e terapêutica constitui, sem dúvida, o *primus mobilis* da pesquisa antigénica que tem vindo a ser efectuada nos últimos anos. Epitopos determinantes em patologia podem estar ausentes em extractos comerciais comumente utilizados na prática clínica⁷⁰. O estudo da *Parietária* constitui um desafio, pois o seu comportamento afasta-se das restantes polinoses, situando-se mais próximo de outros alergénios que determinam sintomatologia perannual.

Pesquisas sobre a incidência polínica atmosférica na região Centro do país foram iniciadas em 1978, tendo sido utilizado, até 1981, o método gravimétrico e a partir desse ano, utilizados também métodos volumétricos⁷¹. Existe um certo paralelismo nas contagens efectuadas ao longo destes anos, com pequenas variações anuais, dependentes principalmente de variações meteorológicas. Ao longo de vários anos vão ocorrendo variações mais pronunciadas, estas,

naturalmente, já na dependência de modificações da flora regional e alterações urbanísticas operadas pelo Homem⁷¹. O calendário polínico de 1993, no respeitante ao género das Urticaceae, apresenta um pico polínico muito reduzido em Setembro, comparativamente ao observado em anos anteriores. Este facto pode condicionar queixas por períodos mais restritos observadas em alguns doentes estudados.

O protoplasto do grão de pólen está fortemente protegido por uma dura e espessa parede, a esporoderme. Esta é constituída por duas camadas, uma mais interna e elástica, a intina e outra mais externa e fortemente cutinizada, a exina. A intina é contínua, espessada apenas nas regiões coincidentes com as aberturas da exina e a sua composição química é fundamentalmente celulósico-péptica. A exina é muito resistente à acção de agentes oxidantes e acídicos e é constituída por esporopolenina, substância formada fundamentalmente por duas fracções, uma lipídica e outra lenhínica, embora esta fracção aromática esteja "mascarada" pela fracção lipídica. Além destas duas fracções, a exina contém substâncias pigmentares, que conferem ao pólen diversas colorações, e proteínas que intervêm no processo de fecundação^{43,71}. O elevado teor proteico, evidenciado pela composição do pólen, justifica, sem dúvida, a sua intervenção em processos alérgicos.

As duas espécies de parietária mais frequentes, *judaca* e *officinalis*, foram as mais exaustivamente estudadas. É conhecida a significativa reactividade cruzada existente entre os seus pólenes, particularmente em relação aos alérgenos *major*^{13,14,29,34,37}. Outras espécies do grupo das Urticaceae têm merecido reduzido interesse pela limitada capacidade alergizante que lhe tem sido atribuída²². Este facto foi recentemente questionado por um grupo de trabalho que descreveu a existência de hipersensibilidade com tradução clínica a uma Urticaceae, a *rami*, sem reactividade cruzada com *Parietária*⁴⁰.

A *Parietária lusitanica* apresenta uma distribuição significativa em toda a Europa central e mediterrânica sem nunca ter sido avaliada a sua capacidade alergizante^{13,43}. A investigação mais recente tem vindo a atribuir uma importância crescente a epitopos menos frequentes mas igualmente responsáveis no quadro clínico de grupos populacionais restritos⁷⁰. O conceito de alérgeno *major*, é meramente epidemiológico e não traduz necessariamente a potência alérgica máxima do extracto, ainda que reconhecido em mais de 70% de doentes sensibilizados. Um objectivo claro da investigação, particularmente na vertente terapêutica é a obtenção de proteínas mais imunogénicas e com menor grau de alergenicidade⁷². O trabalho desenvolvido com a *Parietária lusitanica* revelou existirem neste pólen, proteínas alérgicas de baixo peso molecular. Porém, esta foi observada de forma

menos constante que a descrita em outras espécies encontrando-se uma grande heterogeneidade nas respostas IgE específicas.

A intensidade de reacção por teste de hipersensibilidade cutânea (Prick) foi inferior para PI, comparativamente ao observada com a Pj e Po, o que foi interpretado como uma potência alérgica inferior. A interpretação destes resultados pode suscitar dúvidas já que não dispomos de extractos comerciais devidamente standardizados. Procurámos ultrapassar esta limitação preparando a amostra com um conteúdo proteico conhecido e recomendado por grupos europeus que têm vindo a trabalhar na identificação e caracterização de novos alérgenos seguindo o protocolo previamente estabelecido⁷³.

Geralmente, as membranas de nitrocelulose são utilizadas com o objectivo de reter as proteínas presentes numa amostra inicial para estudo imunológico posterior⁵⁷. Imobilizados nesta matriz as proteínas tornam-se mais acessíveis a diversos ligandos. A incubação simultânea de soros de doentes com amostras de Pj e PI previamente separadas por electroforese e transferidas para a membrana de nitrocelulose revelou uma quase total transferência da IgE marcada para o extracto de Pj. A experiência realizada em paralelo utilizando câmaras de transferência separadas identificou as cinco bandas alérgicas da PI, sendo mais constante a situada entre os 10-17KDa, tal como foi observado para a Pj. Este dado está de acordo com a menor reactividade cutânea manifestada para a PI. Com efeito é indiscutível que existem proteínas alérgicas na *Parietária lusitanica*, com pesos moleculares variáveis, mas predominantemente baixos. Estas fracções proteicas terão padrões de migração semelhantes e antigenicidade cruzada para a Pj, mas aparentemente potência alérgica inferior.

O ensaio de desglucosilação comprovou que a actividade alérgica se situa, claramente, na porção proteica a exemplo do que está descrito com outros pólenes¹³.

A associação Doença-H.L.A., além de nos permitir definir grupos de risco, hipoteticamente importante na área de prevenção, fornece sem dúvida informações preciosas para a compreensão da fisiopatologia e, conseqüentemente, da intervenção terapêutica. A associação positiva verificada com o HLA DR11⁵ adquire uma maior relevância, na medida em que foi igualmente verificada no conjunto de doentes também alérgicos a *Parietária*, que têm vindo a ser tipados em Espanha e em Itália, com metodologia semelhante e de acordo com o protocolo de colaboração estabelecido com vista a realizar estudos genéticos de alergia em grupos populacionais alargados⁷⁴. Os doentes H.L.A. DR4 e, aparentemente, os DR3 terão alguma protecção em relação ao aparecimento desta panóplia sintomatológica.