



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

**“Alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum* (Lam. 1779):
determinação da reatividade cruzada de anticorpos IgE aos
componentes alergênicos de extratos comerciais de gramíneas”**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas, como parte das
exigências para obtenção de título de
Mestre

Cristiane Teixeira Vilhena Bernardes

Uberlândia
2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS**

**“Alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum* (Lam. 1779):
determinação da reatividade cruzada de anticorpos IgE aos
componentes alergênicos de extratos comerciais de gramíneas”**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas, como parte das
exigências para obtenção de título de
Mestre

Cristiane Teixeira Vilhena Bernardes

**Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Co-Orientadora: Dra. Mônica Camargo Sopelete**

Uberlândia
2007

O Quase

Ainda pior que a convicção do não, a incerteza do talvez é a desilusão de um "quase".

É o quase que incomoda, que entristece, que mata, trazendo tudo que poderia ter sido e não foi.

Quem quase ganhou ainda joga, quem quase passou ainda estuda, quem quase morreu está vivo, quem quase amou, não amou.

Basta pensar nas oportunidades que escaparam pelos dedos, nas chances que se perdem por medo, nas idéias que nunca sairão do papel por essa maldita mania de viver no outono do quase....

Pergunto então, às vezes, o que nos leva a escolher uma vida morna; ou melhor, não pergunto, contesto.

A resposta sei de cor, está estampada na distância e frieza dos sorrisos, na frouxidão dos abraços, na indiferença dos "Bom dia", quase que sussurrados.

Sobra covardia e falta coragem até pra ser feliz.

A paixão queima, o amor enlouquece, o desejo trai. Talvez esses fossem bons motivos para decidir entre a alegria e a dor, sentir o nada, mas não são.

Se a virtude estivesse mesmo no meio termo, o mar não teria ondas, os dias seriam nublados e o arco-íris teria somente tons de cinza.

O nada não ilumina, não inspira, não aflige nem acalma, apenas amplia o vazio que cada um traz dentro de si.

Não é que fé mova montanhas, nem que todas as estrelas estejam ao alcance, para as coisas que não podem ser mudadas resta-nos somente paciência, porém, preferir a derrota prévia à dúvida da vitória é desperdiçar a oportunidade de merecer.

Pros erros, há perdão; pros fracassos, chance; pros amores impossíveis, tempo. De nada adianta cercar um coração vazio ou economizar alma. Um romance cujo fim é instantâneo ou indolor não é romance.

Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar.

Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive, já morreu!

Luis Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Deus, por ter me dado a vida, uma família maravilhosa, e todas as oportunidades de crescer, progredir como pessoa e ser feliz.

Aos meus pais, Luiz Augusto e Elisabeth, e aos meus irmãos Daniel e Iara, pelo amor, carinho, companheirismo, apoio e amor sempre a mim dedicados;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ernesto, pela orientação, amizade e confiança depositada em mim e pelos ensinamentos de cada dia;

À minha grande amiga e co-orientadora Mônica, pelo companheirismo, paciência, compreensão e ensinamentos e principalmente pela amizade sempre sincera;

À Deise, uma pessoa sempre prestativa e disposta em ajudar e ensinar todos nós, contribuindo para o enriquecimento de nossos trabalhos.

Ao Prof. Francisco Vieira, pela contribuição no estudo, quanto ao envio de soros de pacientes com polinose;

Aos amigos do grupo de alergia: Karine, Ronaldo, Rafael, Jorge, Diego, Sheilla, Gesmar, Fabiola, Juliana, Renato, Núbia e a todos que já passaram ou que estão chegando;

Aos grandes amigos Priscila, Raquel, Leandro, Samantha e Caroline e todos que em mensagens e pensamentos sempre se fizeram presentes, pessoas muito especiais em minha vida;

Aos amigos do Laboratório de Imunologia, em especial: Fernando, Janaina, Cristina, Ana Cláudia, Carol, Gabriele, Belisa, Karine Rezende, Thaisa, Maria, Áurea, Marley, pelos maravilhosos momentos de convivência no laboratório e pelas trocas de experiências e conhecimentos;

Às professoras Dra. Júlia e Dra. Janethe, e ao professor Dr. José Roberto Mineo, pelas sugestões na banca de qualificação, contribuindo para o melhoramento do trabalho;

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho e Prof. Dra. Maria Aparecida de Souza, pela aceitação e disponibilidade em participar da etapa final deste estudo;

A todos os funcionários e pesquisadores do Laboratório de Imunologia, pela disposição em ajudar sempre que necessário;

Aos secretários João Martins Neto e Lucileide de Freitas Queiróz Damásio por estarem sempre prontos a nos ajudar, esclarecendo nossas constantes dúvidas;

A todos voluntários, que participaram do estudo contribuindo para a execução do mesmo;

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, fica aqui meu eterno agradecimento.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Atopia e alergia.....	7
1.2. Pólen e alérgenos.....	8
1.3. Polinose	9
1.4. Polinose no mundo e no Brasil	12
1.5. Pólens alergógenos no Brasil.....	14
1.6. <i>Lolium multiflorum</i>	15
1.7. Alérgenos de pólen de gramíneas da família Poaceae.....	16
1.8. Reatividade cruzada entre alérgenos de pólen de gramíneas da família Poaceae.....	19
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Aspectos éticos.....	24
3.2. Local do Estudo.....	24
3.3. Coleta de grãos de pólen de <i>L. multiflorum</i>	25
3.4. Extração alergênica.....	26
3.5. Preparação dos extratos comerciais para os testes de inibição competitiva	26
3.6. Dosagem protéica.....	27
3.7. Preparação do extrato alergênico para teste cutâneo de puntura.....	27
3.8. Termo de consentimento e avaliação clínica e física dos indivíduos da pesquisa.....	27
3.9. Teste cutâneo de puntura.....	28
3.10. Seleção de pacientes com polinose e grupos controles.....	29
3.10.1. Pacientes sintomáticos com polinose.....	29
3.10.2. Pacientes alérgicos a ácaros da poeira domiciliar e indivíduos não atópicos.....	30
3.11. Critérios de exclusão.....	30

3.12. Coleta de sangue.....	31
3.13. Ensaio imunoenzimático – ELISA para detecção de IgE específica a alérgenos de pólen de <i>L. multiflorum</i>	31
3.14. Imunoensaios ELISA de inibição competitiva.....	33
3.15. SDS-PAGE – Eletrofores em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio.....	34
3.16. <i>Immunoblotting</i> para detecção de frações alergênicas de pólen de <i>L. multiflorum</i> ligantes de IgE.....	34
3.17. <i>Immunoblotting</i> de inibição competitiva.....	36
3.18. Normas de biossegurança.....	37
3.19. Análise estatística.....	38
4. RESULTADOS	39
4.1. Características gerais e resultados do teste cutâneo de puntura dos pacientes e indivíduos não atópicos do estudo.....	39
4.2. Ensaio imunoenzimático – ELISA, para detecção de IgE específica a alérgenos de pólen de <i>L. multiflorum</i>	42
4.3. Ensaio de inibição competitiva por ELISA – IgE.....	44
4.4. Identificação das frações alergênicas de Lm por <i>Immunoblotting</i>	46
4.5. <i>Immunoblotting</i> de inibição competitiva.....	47
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	65
7. REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8. ANEXOS	76
ANEXO 1.....	76
ANEXO 2.....	77
9. APÊNDICE	78
APÊNDICE 1.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	<i>2'2-azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid</i>
BSA	soroalbumina bovina
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
°C	grau Celsius
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DAB	3,3' - diaminobenzidina
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
DO	densidade óptica
Dp	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DP	Desvio Padrão
EGTA	ácido etileno glicol tetracético
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
ELISA-IgE	ensaio imunoenzimático específico para detecção de anticorpos IgE
EUA	Estado Unidos da América
g	Gramma
g	força relativa da gravidade
GI	Extrato comercial Gramíneas I
GII	Extrato comercial Gramíneas II
HC-UFU	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	Índice ELISA
IgE	imunoglobulina E
IgG	imunoglobulina G
IL	interleucina
I ₅₀	Índice de inibição 50%
I ₈₀	Índice de inibição 80%
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
IUIS	<i>International Union of Immunological Societies</i>
kDa	kilodalton
km	quilômetros
Lm	extrato bruto de pólen de <i>Lolium multiflorum</i>
Lp	extrato bruto de pólen de <i>Lolium perenne</i>
Lol p 1	alérgeno do grupo 1 de <i>Lolium perenne</i>
Lol p 5	alérgeno do grupo 5 de <i>Lolium perenne</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
m	Metros
m ³	Metros cúbicos
ma	média aritmética
mA	Miliampére
mM	Milimolar
M	Molar
mL	mililitro

mm	milímetro
MG	Minas Gerais
Mr	Massa molecular relativa
µg	micrograma
NA	Grupo de indivíduos não atópicos
nm	Nanômetro
<i>P</i>	Probabilidade
PAR	Perennial allergic rhinitis patients group
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 (<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i>)
PBS-T-BSA	solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e soroalbumina bovina 1%
PBS-T-M	solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e molico a 1%
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
RAP	Grupo de pacientes com Rinite Alérgica Perene
RAP _{CS}	Subgrupo de pacientes RAP residentes em Caxias do Sul
RAP _{UDI}	Subgrupo de pacientes RAP residentes em Uberlândia
RAS	Grupo de pacientes com Rinite Alérgica Sazonal
RAST	<i>Radio Allergo Sorbent Test</i>
RS	Rio Grande do Sul
rs ²	Coefficiente de correlação de Spearman
RAST	<i>radioallergosorbent test</i> (Radioimunoensaio)
SAR	Sazonal allergic rhinitis patients group
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
SPT	Skin prick test
TCP	teste cutâneo de puntura
Th2	linfócito T <i>helper</i> 2
Tris	hidroximetil-aminometano
UBE	Unidade Biológica Equivalente (designa-se uma atividade de 10.000 UBE a um valor SPT de 1 mg/mL de alérgeno (unidade de massa com os alérgenos maiores) de cada extrato)
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UI/mL	unidade internacional por mililitro
µL	microlitros
v:v	Volume a volume
≅	Aproximadamente

RESUMO

Introdução: *Lolium multiflorum* (Lm), gramínea da família Poaceae, é a principal causadora de polinose na região Sul do Brasil. Não há ainda estudos de reatividade cruzada entre frações alergênicas de pólen de *L. multiflorum* com de outras espécies de gramíneas.

Objetivos: Avaliar a sensibilização a alérgenos de pólen de Lm em pacientes com polinose por teste cutâneo de puntura (TCP) e da detecção de IgE específica por ensaio imunoenzimático (ELISA). Determinar a reatividade cruzada entre frações alergênicas do extrato de pólen de *L. multiflorum* (Lm) e extratos comerciais de pólenes de gramíneas.

Material e métodos: Amostras de soro de 38 pacientes com rinite alérgica sazonal (grupo RAS), 35 pacientes com rinite alérgica perene (grupo RAP) e 30 indivíduos não atópicos (grupo NA) foram testadas para a reatividade de IgE. A sensibilização foi analisada através de teste cutâneo de puntura e os níveis de IgE específica a pólenes de *L. multiflorum* foram determinados por ELISA. Ensaio ELISA e *Immunoblotting* de inibição foram empregados na determinação da reatividade cruzada ente alérgenos de pólen de *L. multiflorum* e de extratos comerciais de gramíneas.

Resultados: A positividade ao TCP com extratos de pólen de gramíneas foi utilizada como critério de inclusão de pacientes no grupo RAS. Anticorpos IgE específicos a Lm foram detectados no soro de 100% dos pacientes com rinite sazonal (RAS) e em 8,6% dos pacientes com rinite perene (RAP). Inibições observadas no ELISA para detecção de IgE a Lm, demonstraram reatividade cruzada entre Lm, *L. perenne* (Lp) e Gramíneas II (GII), mas não entre Gramíneas I (GI). Foram observadas 14 frações ligantes de IgE, sendo as de 26, 28 e 32 kDa as mais freqüentes (> 90%). Em *Immunoblotting* de inibição, Lm, Lp e GII inibiram significativamente a ligação de IgE à maioria das frações imunodominantes de Lm, sendo a de 55 kDa a mais inibida. A fração de 26 kDa não foi inibida pelo extrato Lp, mas sim pelos extratos Lm e, GII em menor proporção.

Conclusões: A utilização de extrato de pólen Lm deve ser preferida a aqueles que apresentam proximidade filogenética com essa gramínea, quando da necessidade de determinações de sensibilização mais precisas no diagnóstico, como também o seu emprego na imunoterapia da polinose causada por alérgenos de pólen de *L. multiflorum*.

Palavras Chave: pólen, polinose, rinoconjuntivite alérgica, alergia a pólen de gramíneas, *Lolium multiflorum*, reatividade cruzada, IgE, *Immunoblotting*

ABSTRACT

Background: *Lolium multiflorum* (Lm) grass pollen, Poaceae family, is the major cause of pollinosis in South Brazil. There are no studies evaluating the cross-reactivity between allergenic fractions from *L. multiflorum* and other pollen grass species.

Objective: To evaluate the sensitization to Lm pollen allergens in patients with pollinosis through the detection of specific IgE by skin prick test (SPT) and immunoassays (ELISA). To characterize immunodominant fractions from *L. multiflorum* pollen allergens, and cross-reactivity with other allergens from commercial grass pollen extracts.

Methods: Thirty eight serum samples from patients with seasonal allergic rhinitis (SAR group), 35 serum samples from patients with perennial allergic rhinitis (PAR group) and 30 serum samples from non atopic patients (NA group) were tested for IgE reactivity. The sensitization was evaluated using SPT and IgE specific levels against *L. multiflorum* pollen extract were determined by ELISA. Inhibition ELISA and Immunoblotting were used to evaluate the cross-reactivity between allergens from *L. multiflorum* and commercial grass pollen extracts.

Results: Serum specific IgE antibodies against Lm were detected in 100% of patients from SAR group and in 8.6% of patients from PAR group. Inhibitions observed in specific IgE ELISA demonstrated Lm cross-reactivity between homologous (Lm) and heterologous (*L. perenne* [Lp] or Gramíneas II [GII]) grass pollen extracts, but not for Gramíneas I (GI). Fourteen IgE binding fractions were observed and the fractions of 26, 28 and 32 kDa were the most frequent (> 90%). For IgE Immunoblotting inhibition Lm, Lp and GII inhibited significantly IgE binding to the most Immunodominant fractions of Lm, particularly the 55kDa fraction. The 26 kDa fraction were not inhibited by the Lp extract, but it was inhibited by Lm and, GII in lower proportion.

Conclusion: Lm pollen extract is more appropriate instead of other phylogenetic related grass pollens for determining quantitative sensitization in diagnostic and therapeutic purposes to pollinosis due to *L. multiflorum* pollen.

Key Words: pollen, pollinosis, allergic rhinoconjunctivitis, grass pollen allergen, *Lolium multiflorum*, cross-reactivity, IgE, Immunoblotting

1. INTRODUÇÃO

1.1. Atopia e alergia

O termo atopia foi empregado primeiramente por Coca e Cooke em 1923 para descrever um grupo de doenças que tinham, em comum, um mecanismo fisiopatológico, envolvendo reações de hipersensibilidade do tipo I, onde os indivíduos apresentavam testes cutâneos positivos para aeroalérgenos e história familiar de asma, rinite, febre do feno e/ou dermatite atópica (COCA; COOKE, 1923 apud JOHANSSON et al., 2001). Mais recentemente, Johansson et al. (2001) propuseram a seguinte definição: Atopia é uma tendência pessoal ou familiar a produzir anticorpos IgE, em resposta a baixas doses de alérgenos, frequentemente proteínas, e desenvolver sintomas típicos, como asma, rinoconjuntivite alérgica ou dermatite atópica. O estado atópico é reconhecido: por teste cutâneo, pela presença de IgE alérgeno-específica, pela elevação da IgE sérica total e pela presença de eosinófilos no sangue (COOKSON, 1999).

A alergia é um dos principais problemas de saúde da sociedade moderna (RING et al., 2001), sendo que os principais alérgenos inaláveis encontrados em nosso meio são oriundos de ácaros da poeira domiciliar do gênero *Dermatophagoides*, pólenes, fungos do ar, baratas e epitélio de animais.

Alérgenos são substâncias capazes de desencadear resposta imunológica com a produção de imunoglobulinas da classe E (IgE) em indivíduos atópicos. O contato inicial do alérgeno com a mucosa leva à produção de IgE, sendo que a resposta pela IgE é um evento local, que ocorre no sítio de entrada do alérgeno no organismo, isto é, em superfícies mucosas e/ou em linfonodos locais (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

No caso da polinose (febre do feno ou “hay fever”), os antígenos de pólen podem provocar, sintomas clínicos relacionados à rinoconjuntivite polínica, quando em contato com a mucosa do aparelho respiratório e a conjuntiva de indivíduos previamente sensibilizados (DUTRA; ROSÁRIO FILHO; ZAVADNIAK, 2001).

1.2. Pólen e alérgenos

Os grãos de pólen dispersos ou transportados pelo ar, ditos anemófilos, são os de importância alergológica. Um grão de pólen pode ser transportado por 175 km a uma velocidade média de 10m/segundo. O pólen permanece estável por séculos em uma atmosfera seca (STANLEY; LINSKENS, 1974), sendo que alérgenos de grãos de pólen secos ou desidratados mostram pouca atividade na matriz citoplasmática, mas forte atividade em organelas como mitocôndria, partículas de polissacarídeos e grãos de amido. Acredita-se que alérgenos de pólen sejam extremamente solúveis em água, pois são capazes de evocar uma reação alérgica mediada por IgE dentro de segundos, o que torna seus alérgenos biologicamente e prontamente disponíveis (BEHRENDT; BECKER, 2001). Um estudo realizado com pólen da gramínea *Phleum pratense* confirmou a presença de grânulos de amido carregadores de alérgenos, os quais eram liberados após contato do pólen com a água. Estes grânulos foram reconhecidos pelo soro de ratos sensibilizados ao pólen, e foram responsáveis pelo desencadeamento da proliferação de linfócitos nestes ratos (MOTTA et al., 2004).

Partículas alergênicas são liberadas do citoplasma do pólen, por expulsão, por pelo menos dois mecanismos. Primeiro por difusão rápida em meio isotônico, onde os alérgenos induziriam sintomas alergênicos imediatos nas superfícies mucosas acessíveis, como conjuntiva e mucosa nasal (VRTALA et al., 1993). De acordo com o

segundo mecanismo proposto, a rápida expulsão de materiais respiráveis dos grãos de pólen, contendo alérgenos, permitiria a sua hidratação em meio hipotônico (como por exemplo, água da chuva), que devido ao seu tamanho reduzido alcançariam as vias aéreas inferiores e induziriam sintomas de asma (SUPHIOGLU, 1998).

A liberação de alérgenos de dentro do grão de pólen é um pré-requisito para sua atuação em indivíduos sensibilizados. Existem pelo menos três mecanismos indutores da liberação de alérgenos de pólen: alta umidade; tempestades e chuvas pesadas e, poluentes (BEHRENDT et al., 1997). Desta forma, a liberação de alérgenos de pólen pode ocorrer em dois diferentes compartimentos, na superfície da mucosa do trato respiratório superior após exposição ao pólen e no ar ambiente, no lado externo do organismo animal/humano.

1.3. Polinose

Uma característica da polinose é a periodicidade anual, uma vez que os sintomas, geralmente, ocorrem na mesma época do ano, durante a polinização (SOLOMON, 1984). Entretanto, alguns pacientes sensibilizados a pólen relatam sintomas de alergia antes e após o período de liberação de pólen (LICCARDI et al., 1996; REINBERG et al., 1988) devido, principalmente, à presença de alérgenos no interior das residências, uma vez que animais domésticos, roupas e outros objetos podem albergá-los contribuindo para sua manutenção neste ambiente (FAHLBUSCH et al., 2000).

Clinicamente, a polinose é caracterizada por rinoconjuntivite alérgica e/ou asma brônquica. Os pacientes manifestam prurido ocular com hiperemia conjuntival, coriza, espirros, prurido nasal ou faringo-palatal e ausência ou presença de obstrução nasal. Hiperreatividade brônquica com asma associada pode acontecer em 15% a 20% dos

indivíduos. A hiperemia conjuntival e o prurido ocular são quase constantes na polinose, diferenciando-a do resfriado comum (VIEIRA, 1995). O exame das vias aéreas revela a presença de reação inflamatória, com edema da mucosa nasal e aumentos dos cornetos, com secreção mucosa transparente. O citograma pode mostrar um aumento significativo de eosinófilos, em geral superior a 10% (VIEIRA, 1995).

A sensibilização a alérgenos de pólenes pode ocorrer de forma isolada ou associada à sensibilização a outros alérgenos perenes, como os alérgenos de ácaros da poeira domiciliar do gênero *Dermatophagoides*, fungos, epitélio de animais e baratas. Assim, a sintomatologia pode ocorrer exclusivamente durante a primavera, época da polinização, ou durante todo o ano, porém, nesse último caso, exacerbada na primavera (VIEIRA, 1995). Deste modo, a alergia polínica pode ser inaparente e encoberta, por outras sensibilizações, capazes de alterar o seu quadro clínico característico em alguns casos (MENDES; LACAZ, 1965 apud VIEIRA, 1995).

A repetição por mais de uma estação polínica dos sintomas clássicos de rinoconjuntivite alérgica, associados ou não à asma brônquica, pressupõe o diagnóstico clínico de polinose. A utilização de extrato misto contendo pólenes de diferentes espécies de gramíneas tem sido recomendada, uma vez que ocorre identidade alergênica ou reações cruzadas entre as mesmas (WEBER, 2003). Testes de provocação nasal ou brônquica, com antígenos polínicos e dosagem de IgE específica são métodos auxiliares de diagnóstico (VIEIRA, 1995; SOPELETE et al., 2006). Entretanto, extratos brutos de pólenes, utilizados no diagnóstico (através de testes cutâneos) e na imunoterapia (ARILLA et al., 2001; FAHLBUSCH et al., 1998; ROSÁRIO FILHO, 1987), podem apresentar potência alergênica variável conforme, no caso de pólenes de gramíneas, às condições ambientais de cultivo das plantas (ARILLA et al., 2001), entre espécies da mesma subfamília (DAVIES et al., 2005), do grau de maturação dos grãos de pólen, do

procedimento de extração (MISTRELLO et al., 2002) e da estabilidade do extrato (NIEDERBERGER et al., 1998; NIEMEIJER et al., 1996). Assim, esses extratos contêm uma mistura complexa de proteínas, muitas delas desconhecidas, das quais somente algumas têm atividade alergênica (ARILLA et al., 2001) e em muitos casos, importantes alérgenos podem estar ausentes ou mesmo em baixa concentração ou ainda apresentarem diferentes concentrações em extratos comerciais de uma mesma empresa ou entre empresas (VALENTA; NIEDERBERGER, 2007).

A correlação entre a intensidade da reação produzida pelo alérgeno, a rapidez com que a reação se desenvolve ao TCP e os níveis séricos de anticorpos IgE específicos ao alérgeno, já foi observada e gera assim uma informação útil para o clínico na avaliação do paciente alérgico (ROSÁRIO FILHO; VILLELA, 1997). IgE específico ao pólen de *Lolium multiflorum* podem ser mensurados por ELISA IgE mesmo quando o soro dos pacientes é coletado fora da estação polínica, demonstrando assim que o imunoenensaio ELISA é bastante específico e sensível, e que tem muito a colaborar no diagnóstico dos pacientes com polinose (SOPELETE et al., 2006).

Na polinose, a profilaxia é particularmente difícil. Evitar ou diminuir a exposição ao meio externo é complicado devido à necessidade da permanência dos indivíduos no meio ambiente exterior em atividades de trabalho e lazer e, no meio domiciliar há relato da manutenção dos alérgenos no interior das residências após a estação polínica (FAHLBUSCH et al., 2000). Entretanto, nos dias secos, quentes e com presença de ventos é recomendável ao paciente permanecer em ambiente fechado, se possível com ar condicionado e filtro, utilizar óculos quando do uso de moto ou bicicleta, manter as janelas fechadas em automóveis, evitar passeios em clubes de campo, cortar grama, ou realizar trabalhos de jardinagem (VIEIRA, 1995).

1.4. Polinose no mundo e no Brasil

Pólen de gramíneas é a principal origem de alérgenos ambientais em climas temperados e frios, sendo seu papel extensivamente conhecido e documentado (KNOX; SUPHIOGLU, 1996). Dentre os pacientes alérgicos no mundo, pelo menos 40% estão sensibilizados a alérgenos de pólenes de gramíneas (ANDERSON; LIDHOLM, 2003). Várias espécies de gramíneas produtoras de pólen têm sido reconhecidas como alergênicas, entre elas, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata* e *Cynodon dactylon* (KNOX; SUPHIOGLU, 1996; SUPHIOGLU, 2000; WEBER, 2003). *Lolium perenne* e algumas gramíneas da subfamília Pooideae são importantes fontes de alérgenos em regiões de clima temperado (FREIDHOFF et al., 1986; SMART, TUDDENHAM; KNOX, 1979; WÜTHRICH et al., 1995), enquanto que pólenes de *C. dactylon* são importantes em regiões de clima tropical (SCHUMACHER, 1985). Na Figura 1 estão demonstradas algumas espécies de gramíneas da família Poaceae e sua hierarquia filogenética.

Família	Subfamília	Tribo	Espécie	Nome comum
Poaceae	Panicoideae	Paniceae	<i>Paspalum notatum</i>	Gramma batatais
	Chloridoideae	Cynodonteae	<i>Cynodon dactylon</i>	Gramma seda
	Pooideae	Aveneae	<i>Phleum pratense</i> ²	Gramma timóteo
			<i>Avena sativa</i> ¹	Aveia
			<i>Holcus lanatus</i>	Capim lanudo
			<i>Phalaris aquatica</i>	-
			<i>Anthoxanthum odoratum</i>	Gramma doce
		Poeae	<i>Festuca pratensis</i> ²	Capim do prado
			<i>Dactylis glomerata</i> ²	Dáctilo
			<i>Lolium multiflorum</i>	Azevém anual
			<i>Lolium perenne</i> ²	Azevém perene
			<i>Poa pratensis</i> ²	Gramma azul
		Triticeae	<i>Hordeum vulgare</i> ¹	Cevada
<i>Secale cereale</i> ¹			Centeio	
<i>Triticum sativum</i> ¹			Trigo	

Figura 1. Gramíneas da família Poaceae e sua hierarquia filogenética. O Gênero foi omitido com objetivo de simplificação. Nome comum apresentado refere-se ao nome conhecido em algumas regiões do Brasil. ¹Gramíneas cujos pólenes constituem o extrato comercial Gramíneas I (GI); ² Gramíneas cujos pólenes constituem o extrato comercial Gramíneas II (GII). – sem nome comum conhecido no Brasil. Adaptado de Lovborg et al. (1999).

Na região Sul de nosso país, a sintomatologia clínica devida a alergia a pólen de azevém (*Lolium multiflorum*) inicia-se, geralmente, em setembro, início da estação polínica, e exacerba-se nos meses de outubro e novembro, prolongando-se, em alguns casos, até dezembro/janeiro (ROSÁRIO FILHO, 1983).

Em pesquisa epidemiológica da polinose entre a população geral de algumas cidades do Estado do Rio Grande do Sul (1985-1986), Vieira e Negreiros (1989) estimaram prevalência de 2,3% em Passo Fundo e 4,8% em Caxias do Sul. Valores significativamente menores ($\leq 1,0\%$) foram encontrados na capital Porto Alegre, Pelotas (litoral), Santa Maria (centro), Santo Ângelo (Missões) e Uruguaiana (fronteira oeste).

Posteriormente, em um grande inquérito epidemiológico na cidade de Curitiba, Paraná, Esteves et al. (1999) observaram ao teste cutâneo de puntura positividade a alérgenos de pólen de *L. multiflorum* em 4,7% dos escolares e 15,4% dos adultos investigados. Mais recentemente, Rosário Filho (2002), também em crianças de Curitiba, detectou por teste cutâneo de puntura 16,5% de positividade a extrato de pólen de *L. perenne*.

Posteriormente, empregando questionário do *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC), Vieira e colaboradores (VIEIRA; FERREIRA; MATTER, 2005) estimaram prevalências de 22,1% em Caxias do Sul, RS e de 14,1% em Santo Ângelo, ambas as cidades do Rio Grande do Sul.

1.5. Pólens alergógenos no Brasil

Segundo os princípios de Thomen uma planta para ser considerada causadora de polinose deve ser anemófila, ou seja, ser capaz de distribuir seus pólenes através dos ventos, possuir pólen alergênico, ser abundante e estar próxima do homem. No Brasil, o pólen de gramíneas é responsável por quase a totalidade dos casos de doença polínica, sendo que alérgenos de pólenes de árvores e ervas apresentam menor importância na sensibilização e indução de polinose em indivíduos atópicos (VIEIRA, 2003). Em relação às árvores, espécies da flora da região Sul do Brasil como *Platanus* sp,

Ligustrum sp (ROSÁRIO FILHO, 1984), *Acacia* sp, *Araucária* e *Eucaliptus* distribuem ao seu redor grande quantidade de pólen fortemente alergizante (VIEIRA, 1989). Nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul as gramíneas substituíram em grandes extensões a vegetação natural, e proporcionaram condições para o desenvolvimento de plantas alergênicas (VIEIRA, 2002).

No nosso meio, o *Lolium multiflorum*, conhecido como azevém, ou na língua inglesa, como “italian ryegrass”, é a principal gramínea causadora de polinose (DUTRA; ROSÁRIO FILHO; ZAVADNIAK, 2001). Outras espécies de gramíneas alergênicas crescem desordenadamente nas periferias das cidades e em terrenos abandonados como *Anthoxanthum odoratum*, *Cynodon dactylon*, *Holcus lanatus*, *Phleum pratense*, *Paspalum notatum* e *Bromus* sp, entre outras (KURTZ, 1998; VIEIRA, 2003).

1.6. *Lolium multiflorum*

Lolium multiflorum, apresenta a seguinte classificação taxonômica, resumida:

Reino: Viridiplantae; Filo: Embryophyta; Classe: Liliopsida; Ordem: Poales; família: Poaceae; Subfamília: Pooideae; Gênero: *Lolium* e Espécie: *Lolium multiflorum* (Lam., 1779).

O *L. multiflorum* é uma gramínea com elevado potencial alergênico (ROSÁRIO FILHO, 1986), não nativa no Brasil, trazida por imigrantes europeus, da região mediterrânea européia, para ser usada na agricultura (DUTRA; ROSÁRIO FILHO; ZAVADNIAK, 2001). Sob o ponto de vista ecológico, propaga-se e cresce desordenadamente em terrenos abandonados, nas áreas rurais e urbanas, assim como em parques e ao longo de rodovias (ROSÁRIO FILHO, 1989). Possui características de

excelente adaptação às condições ambientais locais (solo, clima e topografia) e alto valor nutritivo. Foi introduzida como forrageira para os meses de inverno nos Estados da Região Sul do Brasil, e atualmente vem sendo utilizada em consorciação com leguminosas diversas na estação fria e, no verão, com a soja e, como cobertura do solo no denominado “plantio direto” ou “semeadura direta na palha” (VIEIRA, 2003). Uma parte do *L. multiflorum* cultivado segue sua evolução vegetativa e reprodutiva completa para a obtenção de sementes. Nessa circunstância em particular, estima-se que todas as anteras abram, liberando o pólen no ar com o objetivo de fecundar outras flores e assim, produzir sementes (VIEIRA; FERREIRA; MATTER, 2005).

Estima-se que um hectare (100 x 100 metros) de cultivo de azevém produza até 100 kg de pólen, e que um grama desse pólen possua cerca de 100 milhões de grãos, e que, pacientes sensibilizados, altamente atópicos, possam apresentar sintomas, com somente 5 a 10 grãos/m³ de ar (ROSÁRIO FILHO, 1997).

1.7. Alérgenos de pólen de gramíneas da família Poaceae

Plantas da família Poaceae são as principais fontes de alérgenos de pólen de gramíneas, devido a sua ampla distribuição mundial e grande capacidade de produção de pólen (FREIDHOFF et al., 1986; SUPHIOGLU, 2000). As espécies mais importantes são *Lolium perenne*, *Poa pratensis* e *Phleum pratense*, mas outras espécies podem ser importantes clinicamente dependendo da região geográfica (BASS et al., 2000; DAVIES et al., 2005).

Devido à homologia estrutural, similaridades imunoquímicas e reatividade cruzada entre epítomos, os alérgenos de pólen de gramíneas são classificados em grupos de acordo com o *International Union of Immunological Societies – Allergen Nomenclature*

Subcommittee (IUIS) (KING et al., 1995). De uma maneira geral, treze grupos de alérgenos de pólen de gramíneas já foram descritos. No Quadro 1 estão relacionadas algumas espécies de gramíneas da família Poaceae de importância clínica e seus principais alérgenos.

Quadro 1. Relação de gramíneas que produzem pólenes alergênicos da família Poaceae, de acordo com seus respectivos alérgenos e massa molecular relativa (Mr)

Gramíneas da família Poaceae e seus alérgenos			
<i>Lolium perenne</i>	Mr (kDa)	<i>Phleum pratense</i>	Mr (kDa)
Lol p 1	35	Phl p 1	27
Lol p 2	11	Phl p 2	10-12
Lol p 3	11	Phl p 4	55
Lol p 4	50-60	Phl p 5	32-38
Lol p 5	28-32	Phl p 6	13
Lol p 10	12	Phl p 7	6-8
Lol p 11	16	Phl p 12	14
		Phl p 13	55-60
<i>Poa pratensis</i>		<i>Dactylis glomerata</i>	
Poa p 1	33	Dac g 1	32
Poa p 5	28-34	Dac g 2	11
Poa p 10	12	Dac g 3	14
		Dac g 5	31
<i>Phalaris aquatica</i>		<i>Cynodon dactylon</i>	
Pha a 1	34	Cyn d 1	31-32
Pha a 5	31-33	Cyn d 7	12
		Cyn d 12	14

* Fonte: Suphioglu (2000), com modificações.

Do ponto de vista clínico, alérgenos do grupo 1 são os mais importantes, reconhecidos por aproximadamente 95% de todos os pacientes sensíveis a pólen de

gramíneas, seguidos pelos do grupo 5, reconhecido por até 85% destes pacientes (WEBER, 2003). Outros alérgenos importantes são dos grupos 2, 3, 4 e 13, reconhecidos por mais de 50 % dos indivíduos alérgicos a pólen de gramíneas (ANSARI; SHENBAGAMURTHI; MARSH, 1989; FAHLBUSCH et al., 1998; SUCK et al., 2000).

Lolium perenne é uma das principais fontes de proteínas alergênicas por ser mundialmente distribuído e por sua alta produção de pólen durante a floração (SMART; TUDDENHAM; KNOX, 1979). Segundo Ford; Baldo (1986), por SDS-PAGE, o extrato bruto de pólen de *L. perenne* é constituído de pelo menos 14 alérgenos, com massas moleculares variando de 12 a 80 kDa.

Lol p 1 e Lol p 5 já clonados, seqüenciados e bem caracterizados (GRIFFITH et al., 1991; ONG et al., 1993; SINGH et al., 1991) não apresentam homologia significativa em relação à seqüência de aminoácidos. Localizam-se em diferentes compartimentos: Lol p 1, no citosol (SINGH; SMITH; KNOX, 1990; STAFF et al., 1990) e Lol p 5, associado aos grânulos de amido dos grãos de pólen (SINGH et al., 1991). Em estudo de imunolocalização, através de anticorpo secundário marcado com partículas de ouro coloidal, Grote et al. (2000) demonstraram que Lol p 1 pode ser encontrado também na superfície do grão de pólen seco enquanto, Lol p 5 não pode ser detectado na superfície dos grãos.

Vale a pena ressaltar que na literatura existem diferenças entre a massa molecular, deduzida a partir da seqüência de aminoácidos, e o tamanho aparente estimado por SDS-PAGE. Existem várias possíveis explicações para esse comportamento eletroforético dos polipeptídeos no SDS-PAGE, entre eles, a ocorrência de glicosilação, pontos isoelétricos ácidos ou básicos e, alto conteúdo de prolina. No caso das gramíneas, segundo Suck et al. (2000) a alteração de um simples aminoácido pode

promover uma mudança de mais de 10% na mobilidade de proteínas no SDS-PAGE. Adicionalmente, a ocorrência de vários componentes antigênicos de massa molecular semelhante, dentro de uma mesma espécie, pode ser devido à existência de isoformas, como as que ocorrem em Lol p 1 e Lol p 5 (4 e 8 isoformas, respectivamente) (SMITH et al., 1994). No caso das gramíneas, isoformas de uma proteína alergênica são proteínas igualmente reconhecidas por IgE de pacientes alérgicos, sendo que apresentam, freqüentemente, a mesma massa molecular, mas ponto isoelétrico diferentes (ONG et al., 1993; SINGH et al., 1991), decorrentes de modificações pós-traducionais e transcricionais, entre elas, principalmente, glicosilação, hidroxilação e presença de resíduos de cisteína.

Ong et al. (1993) em estudos de *Imunoblotting* verificaram variação na intensidade do sinal de IgE ligante às diferentes isoformas de Lol p 5 (de aproximadamente 27 a 31 kDa) e que 80% dos pacientes possuíam IgE que reconheceu pelo menos duas isoformas de Lol p 5. Swoboda et al. (2002) observaram que mutações pontuais na seqüência de Lol p 5 reduziram a alergenicidade desse alérgeno.

Assim, o conteúdo alergênico de extrato brutos pode diferir não somente quanto ao grau de maturação dos pólenes, os procedimentos de extração alergênica empregados e a estabilidade do extrato (NIEDERBERGER et al., 1998; VRTALA et al., 1993), mas também entre isoformas de proteínas alergênicas de uma mesma espécie de gramínea.

1.8. Reatividade cruzada entre alérgenos de pólen de gramíneas da família Poaceae

As gramíneas podem apresentar epítomos de alérgenos de pólen compartilhados, sendo inclusive demonstradas similaridades imunoquímicas e estruturais entre seus principais alérgenos (FAHLBUSCH et al., 1998; WEBER, 2003). Esse

compartilhamento de epítomos entre espécies também é conhecido como reatividade cruzada. Resumidamente, a definição de reatividade cruzada entre alérgenos baseia-se no reconhecimento imunológico: dois alérgenos apresentam reatividade cruzada se houver um único anticorpo que reaja a ambos (AALBERSE; AKKERDAAS; VAN REE, 2001).

Classicamente, anticorpos reativos a pelo menos 15 aminoácidos são ditos direcionados a epítomos lineares, enquanto que aqueles que não reagem a seqüências lineares são classificados como ligantes de epítomos conformacionais (AALBERSE; AKKERDAAS; VAN REE, 2001). Em proteínas ou glicoproteínas, a interação entre um anticorpo e um epítomo (antígeno/alérgeno) ocorre via superfície. Isso não quer dizer que a parte abaixo da superfície da proteína não seja importante, pelo contrário, ela é essencial no dobramento e configuração da proteína. Mutações na seqüência de aminoácidos (mesmo de 1 aminoácido) na parte interna podem resultar em mudança na conformação da proteína e, conseqüentemente, na afinidade ao anticorpo (AALBERSE; AKKERDAAS; VAN REE, 2001). Sendo assim, juntamente com a homologia na seqüência de aminoácidos a homologia da estrutura tridimensional potencializa a reatividade cruzada entre proteínas, resultando em reatividade cruzada de alta afinidade (AALBERSE; AKKERDAAS; VAN REE, 2001).

O alto grau de homologia entre proteínas geralmente resulta em reatividade cruzada e conseqüentemente reflete as relações filogenéticas entre os organismos. O seqüenciamento de alérgenos de pólen do grupo 1 em oito espécies de gramíneas demonstrou alto nível de conservação na seqüência de aminoácidos, incluindo a presença de sete resíduos de cisteínas. O alto grau de conservação de resíduos de cisteína sugere um padrão comum na formação de pontes dissulfeto e no dobramento das proteínas do grupo 1 nessas gramíneas (SHCHERBAN et al., 1995).

Para avaliar a existência de reatividade cruzada entre alérgenos de gramíneas têm-se utilizado ensaios de inibição competitiva, como RAST e ELISA (BERSTEIN et al., 1976; SOPELETE et al., 2006) e o advento da técnica de *Immunoblotting* de inibição possibilitou a identificação e a análise da força de reconhecimento por IgE das frações de reatividade cruzada entre extratos (SUCK et al., 2000).

Estudos realizados com pólen de gramíneas da família Poaceae demonstraram uma forte reatividade cruzada baseada nos marcadores dos alérgenos principais de pólen dos grupos 1, 2/3, 5 e 12 (WEBER, 2003; ANDERSON; LIDHOLM, 2003). Entretanto, apesar da existência de reatividade cruzada, deve-se enfatizar que alérgenos únicos de determinadas espécies também ocorrem. É o caso dos alérgenos de pólen de *P. notatum* e de *C. dactylon* que demonstraram ter uma limitada reatividade cruzada a *L. perenne* e a outras gramíneas clinicamente relevantes (DAVIES et al., 2005; WEBER, 2003).

Apesar dos esforços em desenvolver extratos padronizados com atividade biológica e reatividade de IgE conhecidos ou da determinação da concentração dos principais alérgenos, muitos extratos de pólen de gramíneas constituem-se ainda de misturas de componentes alergênicos e não alergênicos (VALENTA; NIEDERBERGER, 2007). Aliado a isso, considerando-se a existência de reatividade cruzada, extratos totais ou parcialmente purificados de pólen de uma espécie de gramínea vêm sendo utilizados no diagnóstico e na imunoterapia (AALBERSE; AKKERDAAS; VAN REE, 2001). Entretanto, apesar da existência de reatividade cruzada, deve-se analisar a sensibilização individual do paciente uma vez que alérgenos únicos de determinadas espécies também ocorrem (DAVIES et al., 2005; WEBER, 2003).

Poucos estudos foram desenvolvidos para identificar as principais frações alergênicas presentes em extratos de pólen de *L. multiflorum* reconhecidas por IgE de

pacientes com polinose (SOPELETE et al., 2006), sendo completamente inexistentes dados que caracterizem as frações de reatividade cruzada entre alérgenos de pólen de *L. multiflorum* com os de outras espécies de gramíneas. Assim, estudos que caracterizem os principais alérgenos de *L. multiflorum* e sua relação com alérgenos de pólen de outras gramíneas a ela relacionada são importantes no desenvolvimento de extrato alergênico, com objetivo de otimizar o diagnóstico e imunoterapia específica para pólen de *L. multiflorum*.

2. OBJETIVOS

1. Avaliar a sensibilização alérgica ao pólen de *L. multiflorum* em pacientes atópicos, por meio de teste cutâneo de puntura utilizando extratos de pólen de gramíneas.

2. Determinar os níveis séricos de IgE específica aos alérgenos de pólen de *L. multiflorum* por ELISA-IgE.

3. Analisar a reatividade cruzada de anticorpos IgE de *L. multiflorum* de pacientes com polinose aos componentes alérgicos presentes nos extratos de pólen de *L. perenne* e extratos mistos Gramíneas I e Gramíneas II, por imunoenaios ELISA de inibição competitiva.

4. Identificar as frações alérgicas do extrato total de pólen de *L. multiflorum* reconhecidas por anticorpos IgE de pacientes com polinose, por *Immunoblotting*.

5. Determinar a reatividade cruzada de anticorpos IgE específicos a alérgenos de pólen de *L. multiflorum* de pacientes com polinose às frações alérgicas presentes nos extratos de pólen de *L. perenne* e extratos mistos Gramíneas I e Gramíneas II, por *Immunoblotting* de inibição competitiva.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

O Projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos, seguindo normas da Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde (CNS) do Ministério da Saúde e aprovado em 22 de setembro de 2003, sob processo número CEP 089/2003 (ANEXO 1).

3.2. Local do estudo

Grãos de pólen de *L. multiflorum* foram coletados em fazendas do município de Caxias do Sul, durante estação polínica do azevém, em outubro de 2003. Pacientes e indivíduos que constituíram os três grupos de estudo eram moradores das cidades de Caxias do Sul e de Uberlândia, onde foram selecionados em suas respectivas cidades. Caxias do Sul, distante 136 km de Porto Alegre, capital do Estado do Rio Grande do Sul, situa-se na Região Sul e localiza-se (longitude 51°W, latitude 29°S) na encosta superior do Nordeste do Rio Grande do Sul, parte na extremidade leste da microrregião vitivinícola. Com uma área territorial de 1.588,4 km² de extensão, Caxias do Sul está de 760 a 800 metros acima do nível do mar, o que determina um clima do tipo Subtropical de altitude com temperatura mínima de -8°C e máxima de 35°C (média de 16°C) e umidade relativa do ar de 84% (Prefeitura Municipal de Caxias do Sul). A população estimada para o ano de 2005 foi de 400.000 habitantes, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2007).

Uberlândia, situada no Sudeste do Brasil, distante 563 km de Belo Horizonte, capital do Estado de Minas Gerais, localiza-se (longitude 48°W, latitude 18°S) na região conhecida como Triângulo Mineiro. Com uma área territorial de 4.116 km² e população estimada para o ano de 2006 de 615.000 habitantes (IBGE, 2007) é uma cidade com clima do tipo Tropical chuvoso, sendo que a vegetação característica é o cerrado.

As análises *in vitro* foram desenvolvidas no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

3.3. Coleta de grãos de pólen de *L. multiflorum*

Plantas de *Lolium multiflorum* são cultivadas, como forrageira ou para cobertura de solo, em fazendas do município de Caxias do Sul. Cerca de 3 gramas de grãos de pólen foram coletados durante a estação de florescimento do azevém em outubro de 2003, pelo Prof. Dr. Francisco de Assis Machado Vieira. Os grãos de pólen liberados das anteras por agitação vigorosa, foram contidos em sacos de papel e transferidos para tubos de ensaio. Os tubos devidamente lacrados e identificados foram mantidos a 4°C em embalagem hermética e enviados por via aérea ao Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia.

O Material enviado ao Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica foi peneirado (Standard Sieve Series, ASTM, EUA; poros de 56 µm) para retirada de impurezas e posteriormente macerado em graal e pistilo, e novamente acondicionado em tubos de ensaio, devidamente lacrados, onde permanece armazenado a 4°C até os procedimentos de extração alergênica. A pureza dos grãos peneirados (aproximadamente 99%) foi analisada por microscopia de luz, com aumento de 40 vezes (40x).

3.4. Extração alergênica

Após serem peneirados e macerados, procedeu-se a extração antigênica dos pólenes de *Lolium multiflorum* pela adição de solução salina tamponada com fosfatos (PBS 0,01 M; pH 7,2), seguindo metodologia descrita anteriormente (SOPELETE et al., 2006). Em seguida, foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases- Leupeptina 1 μ M (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA, L-2884), PMSF 1mM (Sigma, P-7626), Benzamidina 1mM (Sigma, B-6506) e Aprotinina 10 μ g/mL (Sigma, A-6279), seguido de incubação a 4°C por 18 horas sob agitação orbital constante.

O conteúdo foi centrifugado (20.000 x g por 30 minutos a 4°C) (Sigma Laborzentrifugg 2K11) e o sobrenadante final obtido foi dialisado (SPECTRA/POR[®] molecular porous membrane tubing MWCO: 6-8.000; Spectrum Medical Industries Inc., Houston, TX, EUA) contra PBS a 4°C, por 20 horas, sob leve agitação. O extrato dialisado foi alíquotado e armazenado a – 20 °C.

3.5. Preparação dos extratos comerciais para os testes de inibição competitiva

Os extratos comerciais utilizados foram adquiridos da empresa IPI/ASAC Brasil (IPI/ASAC, São Paulo, Brasil) e posteriormente dialisados em PBS 0,01 M, pH 7,2, utilizando um volume final de 10 vezes o volume inicial de extrato, em sistema *Amicon* (Amicon bioseparations[®] ultrafiltration membranes NMWL 3,000, Millipore Corporation, Bedford, MA 01730, EUA). Após a diálise os extratos foram alíquotados e armazenados a – 20 °C.

3.6. Dosagem protéica

O conteúdo protéico do extrato de pólen de *L. multiflorum* (Lm) e dos extratos comerciais utilizados foi estimado pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando uma curva padrão de proteína, a soroalbumina bovina (BSA), em diluição dupla seriada de 500 µg/mL a 15,6 µg/mL. A leitura da reação foi realizada a 660nm em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, SP, Brasil). A concentração protéica foi determinada em mg/mL, utilizando-se o *software Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA)*.

3.7. Preparação do extrato alergênico para teste cutâneo de puntura

Para a preparação do extrato para teste cutâneo de puntura (TCP), o extrato de pólen de *L. multiflorum* (Lm) foi diluído em PBS fenol 0,4 % e glicerina a 50% em uma concentração final de 1 mg de proteína/mL. O extrato alergênico glicerinado de *L. multiflorum* foi acondicionado em frascos com conta-gotas e mantido a 4°C até o momento do uso no TCP.

3.8. Termo de consentimento e avaliação clínica e física dos indivíduos da pesquisa

A concordância em participar da pesquisa foi confirmada pela assinatura do termo de consentimento pós-informado (ANEXO 2) pelos indivíduos da pesquisa (ou por seu responsável legal, em caso de menores de 18 anos), de acordo com as normas da Resolução CNS 196/96. No termo de consentimento consta o nome da pesquisa, bem como seu objetivo, os procedimentos a serem realizados, como coleta de sangue e teste

cutâneo de leitura imediata, e a possibilidade de saída do estudo sem necessidade de explicação prévia ou prejuízo ao atendimento atual ou futuro dos sujeitos da pesquisa.

Em seguida, os sujeitos foram avaliados através de exame clínico e físico pelos seguintes médicos especialistas em alergia pela Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia:

- Prof. Dr. Francisco de Assis Machado Vieira (Caxias do Sul – RS) – médico alergista e professor titular de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade de Caxias do Sul, RS; avaliou os pacientes residentes em Caxias do Sul.

- Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi (Uberlândia, MG) – médico alergista e professor titular de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), chefe do Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica e médico responsável pelo Ambulatório de Alergia e Imunologia Clínica do Hospital de Clínicas da UFU (HC-UFU); avaliou os pacientes e indivíduos residentes em Uberlândia.

3.9. Teste cutâneo de puntura

A hipersensibilidade imediata a alérgenos de pólen de *L.multiflorum* foi determinada por meio de TCP. Para a realização do teste foi empregado extrato alergênico glicerinado de pólen de *L. multiflorum* a 1mg/mL, conforme anteriormente descrito e extrato comercial de pólen de gramíneas (Gramíneas II, IPI/ASAC), contendo pólenes de *Dactylis glomerata*, *Festuca pratensis*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis* e *Phleum pratense* a 10.150 UBE/mL.

Na execução dos testes de puntura nos pacientes atópicos e indivíduos não atópicos também foram utilizados extratos alergênicos de ácaros das espécies *Dermatophagoides*

pteronyssinus (Dp), *Dermatophagoides farinae* (Df) e *Blomia tropicalis* (Bt) (IPI/ASAC), além de extratos de epitélio de cão, epitélio de gato, *Blattella germanica*, *Periplaneta americana* e *Alternaria alternata* (IPI/ASAC).

Foi depositada uma gota de aproximadamente 10 µL de cada extrato alergênico na face interna do antebraço, após anti-sepsia do mesmo com álcool 70%, distanciando 3 cm uma da outra. Sobre a gota depositada foi feita uma punção, com uma lanceta estéril de metal.

Após 15 minutos procedeu-se a leitura da reação com auxílio de paquímetro ou uma régua específica graduada em milímetros (mm). Em todos os testes, foi realizado controle positivo com cloridrato de histamina (10 mg/mL) (*Hollister-Stier Laboratories LLC, Spokane, EUA*) diluído em solução salina fisiológica com glicerol a 50%, sendo que essa última foi usada também como controle negativo da reação. Foi adotado como critério de positividade uma pápula > 3mm em relação à pápula formada com o controle negativo da reação (dilúente dos extratos alergênicos), obtida pela média de dois diâmetros perpendiculares (SOPELETE et al., 2006).

3.10. Seleção de pacientes com polinose e grupos controles

3.10.1. Pacientes sintomáticos com polinose

Foram selecionados randomicamente, 38 pacientes apresentando polinose (rinite alérgica sazonal: RAS), caracterizada clinicamente por rinite alérgica e/ou conjuntivite e/ou asma brônquica de moderada a grave, de acordo com exame físico e TCP positivos para extrato glicerinado Lm e para o extrato comercial contendo uma mistura de pólenes de gramíneas, Gramíneas II (IPI/ASAC), e positivos ou não a extratos brutos de ácaros da poeira domiciliar (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis*). Estes pacientes foram

selecionados na Clínica de Alergia do Professor Dr. Francisco de Assis Machado Vieira na cidade de Caxias do Sul – RS, e denominados de grupo RAS, estes constituíram um grupo de indivíduos na faixa etária de 15 a 55 anos, de ambos os sexos.

3.10.2. Pacientes alérgicos a ácaros da poeira domiciliar e indivíduos não atópicos

Um grupo controle foi constituído por 35 pacientes atópicos, sintomáticos, apresentando quadro clínico de rinite alérgica perene (RAP) a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis*) e com teste cutâneo negativo para o extrato de pólen de *L. multiflorum* e Gramíneas II (TCP), porém positivos a extratos brutos de alérgenos de ácaros da poeira domiciliar. Este grupo foi denominado RAP. Destes 35 pacientes, 19 foram selecionados em Caxias do Sul, sendo denominados de subgrupo RAP_{CS}, e 16 foram selecionados em Uberlândia e constituíram o subgrupo denominado RAP_{UDI}. Um segundo grupo controle foi constituído por 30 indivíduos, assintomáticos quanto a qualquer doença alérgica (não atópicos) e com teste cutâneo negativo aos extratos Lm, GII, ácaros da poeira domiciliar, epitélio de cão e gato, baratas e fungo (grupo não atópico – NA), sendo todos selecionados na cidade de Uberlândia.

3.11. Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão dos pacientes e indivíduos da pesquisa consistiram de infecções respiratórias do trato respiratório superior nos últimos 30 dias antes do estudo, uso de anti-histamínicos na semana anterior e uso oral ou tópico de corticosteróides nas

últimas quatro semanas (BERNSTEIN; STORMS, 1995; SLOTT; ZWEIMAN, 1974; PIPKORN; HAMMERLUND; ENERBAECK, 1989).

3.12. Coleta de sangue

Amostras de sangue (15 mL) dos indivíduos da pesquisa foram coletadas durante a estação polínica, na mesma ocasião da realização do teste cutâneo, com a utilização de tubos Vacutainer (Vacutainer – Precision Glide/Becton Dickson Vacutainer System, Franklin Lakes, NJ, EUA) e agulhas (25 x 8 mm) para punção venosa na região do antebraço. Após a formação do coágulo, os tubos foram centrifugados a 1.000 x g por 10 minutos, e os soros obtidos foram aliquotados e armazenados a – 20°C para realização de testes sorológicos.

3.13. Ensaio imunoenzimático – ELISA para detecção de IgE específica a alérgenos de pólen de *L. multiflorum*

Ensaio imunoenzimáticos (ELISA), utilizando amostras de soros de pacientes com polinose (RAS), de pacientes com alergia a outros alérgenos, mas não a pólen (RAP) e de indivíduos não atópicos (NA), foram realizados, segundo técnica descrita por Sopelete et al. (2006). Microplacas de poliestireno de alta afinidade, com 96 poços (Corning Incorporated Costar®, Corning Laboratories Inc., NY, EUA) foram sensibilizadas separadamente com o extrato Lm, na concentração de aproximadamente 20 µg/mL, em um volume de 50µL/poço, diluído em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06M, pH 9,6 por 18 horas.

As placas foram lavadas em PBS acrescida de Tween 20 (Sigma; P-1379) a 0,05% – (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T acrescido de 1% de soroalbumina bovina (BSA, Sigma; A-8022) – PBS-T-BSA – por 1 hora à temperatura ambiente. O PBS-T-BSA foi utilizado como diluente nas etapas seguintes e as placas foram lavadas com PBS-T após cada etapa da reação.

As amostras de soro foram testadas em uma diluição de 1:2, em duplicata, e incubadas a 37°C por 2 horas em câmara úmida. Foram utilizados soros controles positivos e controles negativos em cada placa. Após esta etapa, foi adicionada uma solução contendo IgG de cabra anti-IgE humana marcada com biotina (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, EUA; n° 16-10-04) em uma diluição de 1:1.000 em PBS-T-BSA, e então as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Subseqüentemente, o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma; S-5512) foi adicionado às placas na diluição de 1:1.000 e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos.

Após o último ciclo de lavagens, foi adicionado o substrato enzimático, constituído de uma solução de 2,2'-*diazino-bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid* (ABTS, Sigma; A-1888) 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 contendo água oxigenada 0,03%. A leitura foi realizada em leitor de microplacas ELISA (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA) a 405 nm, em tempos variáveis. O limiar de positividade (*cut off*) foi determinado pela média dos valores de densidade óptica (DO) das amostras de soros controles (em duplicata), acrescidos de cinco desvios padrões (DP), calculado para cada microplaca de ELISA. Os níveis de anticorpos IgE específicos aos alérgenos de pólenes contidos nos extratos analisados foram arbitrariamente expressos em índice ELISA (IE), sendo este índice calculado, em cada amostra de cada microplaca utilizada, pela seguinte fórmula:

$$IE = \frac{DO_{\text{amostra}}}{\text{cut off}}$$

Onde,

IE = índice ELISA

DO = Densidade Óptica

Cut off = Média da DO de 3 amostras de soros negativos + (5 desvios padrões)

Valores de IE > 1,2 foram considerados positivos quanto à presença de IgE específica a alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum* contido no extrato Lm.

3.14. Imunoensaios ELISA de inibição competitiva

A especificidade antigênica dos ensaios imunoenzimáticos para detecção de IgE específica a alérgenos de pólen de *L. multiflorum* foi avaliada utilizando imunoensaio ELISA de inibição competitiva, conforme descrito por Sopelete et al. (2006), com algumas modificações. Para curvas de inibição foram realizadas diluições duplas decimais seriadas em concentrações finais de 200 µg/mL a 2×10^{-5} µg/mL dos extratos de pólen de *L. multiflorum* (Lm), *L. perenne* (Lp), Gramíneas I (extrato comercial IPI/ASAC contendo mistura de pólenes de gramíneas cultivadas das espécies: *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale* e *Triticum sativum*; GI) e Gramíneas II (GII) incubadas por 18 horas a 4°C com um *pool* de 6 amostras de soros de pacientes do grupo RAS, na diluição de 1:5. Após incubação, as misturas antígeno-soro foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Como inibidor controle foi incluído como alérgeno não relacionado, extrato bruto Bt, na mesma diluição utilizada para os outros extratos. As misturas extrato-soro foram incubadas por

18 horas a 4°C e adicionadas às microplacas previamente sensibilizadas com o extrato Lm.

A mistura de soros incubada somente com diluente foi utilizada como controle positivo. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição em relação à reação na ausência de extratos (controle positivo) e calculados pela fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - [(\text{DO amostra} / \text{DO controle positivo}) \times 100]$$

3.15. SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

A amostra do extrato alergênico (extrato total de pólen de *L. multiflorum*) foi submetida à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) a 13,5%, em condições denaturantes e não redutoras, segundo Laemmli (1970).

Inicialmente, a amostra foi centrifugada em alta velocidade (10.000 x g) por 10 minutos, diluída em Tampão de Amostra (Tris 3 mM, SDS a 1 %; azul de bromofenol a 0,025 % e EGTA a 1,1 mM) e aquecida a 100°C durante 5 minutos. A amostra e padrões de massa molecular (Sigma Marker, Sigma; M4038) foram paralelamente aplicados no gel (10µL/poço). O gel foi submetido a uma corrente constante de 20 mA (Mini Protean[®] Cell, Bio-Rad Laboratories, EUA). A migração, das frações protéicas e dos padrões de massa molecular, foi evidenciada com a coloração por impregnação com Nitrato de Prata.

3.16. Immunoblotting para detecção de frações alergênicas de pólen de *L. multiflorum* ligantes de IgE

Após a separação eletroforética, por SDS-PAGE, os componentes protéicos do extrato de pólen de *L. multiflorum* foram transferidos para membranas de nitrocelulose (*Hybond-C Pure; Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido; RPN 303W*). As membranas foram colocadas juntamente com o gel utilizado na separação eletroforética em sistema úmido de transferência (*Mini Trans – Blot[®] Electrophoretic Transfer Cel, EUA*) utilizando técnica conforme descrita pelo fabricante e ambos foram embebidos em tampão de transferência (glicina a 0,04 M, Tris a 0,05 M, SDS a 0,04% e metanol a 20%). A corrente utilizada foi de 90 mA e o tempo de corrida foi de 18 horas. O sucesso da transferência foi confirmado pela visualização das frações protéicas e do padrão de massa molecular (*Sigma Marker, Sigma; M4038*) na membrana de nitrocelulose através de coloração da mesma por solução de Ponceau S a 0,5% (*Merck, Darmstadt, Alemanha, 4566*).

Para determinar a afinidade de IgE pelas frações do extrato Lm, o mesmo foi submetido a ensaios de *Immunoblotting*, de acordo com técnica descrita por Towbin; Staehelin; Gordon (1979). As membranas eletrotransferidas, cortadas em tiras de aproximadamente 0,3 cm de largura foram acondicionadas em placas adequadas para *Immunoblotting* e bloqueadas com 800 µL de solução salina tamponada com Fosfatos (*Merk*) 0,02M contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), acrescida de leite em pó desnatado (*Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil*) a 5% por duas horas a temperatura ambiente, para bloquear os sítios ativos inespecíficos ligantes de proteínas. Os procedimentos de lavagens das tiras de nitrocelulose foram realizados após cada etapa

da reação consistiram de seis ciclos de 5 minutos com solução de PBS-T, em agitação constante.

Amostras de soros de pacientes e indivíduos dos grupos RAS, RAP e NA foram diluídas em uma diluição de 1:5 em PBS-T acrescido de leite em pó desnatado a 1% (PBS-T-M). Um volume de 500 μ L dessas diluições foi adicionado nas canaletas contendo as tiras de membrana de nitrocelulose, previamente bloqueadas e lavadas com PBS-T. Como controles da reação, foram omitidos, em duas tiras de nitrocelulose para cada placa, anticorpos primários e/ou secundários, substituindo-os somente pelo diluente (PBS-T-M).

Em seguida, após lavagens, as tiras foram incubadas com 500 μ L/canaleta do anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgE humana biotinizada (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.) diluído em PBS-T-M, durante duas horas à temperatura ambiente, seguida da adição de 500 μ L/canaleta do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (ABC/HRP Dako Corp., EUA) e de incubação por 2 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente às lavagens finais, as bandas protéicas foram visualizadas através de revelação por adição de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, D-5905) diluída em 15 mL de solução salina tamponada com Tris (Merk) (TBS) a 20 mM, pH 7,2 até a visualização das bandas.

Toda a reação foi conduzida sobre agitação lenta e constante. Para a documentação as tiras foram dessecadas em papel de filtro e digitalizadas. Para se obter os valores de massa molecular das bandas visualizadas no *Immunoblotting* utilizou-se *software Kodak Image Analysis* (Kodak Software, Eastman Kodak Company, 2000) baseando-se nos valores de mobilidade relativa calculados pelo próprio programa a partir dos padrões de massa molecular.

3.17. Immunoblotting de inibição competitiva

A reatividade cruzada da ligação de IgE ligantes das frações protéicas presentes no extrato de pólen de *L. multiflorum*, frente a extratos de outras gramíneas como Lp, GI e GII, foi avaliada utilizando ensaios *Immunoblotting* de inibição competitiva.

Como inibidores foram utilizados os extratos Lm, Lp, GI, GII e Bt (alérgeno irrelevante) em uma diluição final de 200µg/mL em diluente PBS-T-M. Cada antígeno foi misturado (v:v) com cada amostras de soro de todos os pacientes do grupo RAS em uma diluição de 1:5 e a mistura foi pré-incubada por duas horas a 37°C em banho-maria. Amostra de soro incubada somente com diluente foi utilizada como controle positivo. Após incubação, as misturas antígeno-soro foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi testado em *Immunoblotting* para IgE como descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em porcentagens de inibição da reação em relação à ausência dos extratos alergênicos inibidores e para os cálculos de intensidade das bandas em *pixels* foi utilizado o *software Kodak Image Analysis (Kodak)*.

3.18. Normas de biossegurança

Todos os procedimentos, desde a coleta até o manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização de equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Chaves-Borges; Mineo (1997).

3.19. Análise estatística

Inicialmente foi realizado teste de normalidade a fim de avaliar o comportamento das variáveis analisadas (*Kolmogorov-Smirnov test* seguido do teste *Dallal-Wilkinson-Lilliefor* para cálculo do valor de *P*).

Diferenças entre porcentagens de positividade entre grupos e entre extratos ao TCP foram analisadas pelo teste de probabilidade exato de Fisher. Correlação entre o diâmetro médio obtido no TCP entre os extratos Lm e Gramíneas II foram realizados pelo teste de *Spearman* (correlação não paramétrica).

Para comparações entre extratos e grupos quanto tamanho médio de pápula ao TCP, níveis de IgE específica foi realizada pelo teste *Kruskal-Wallis*, usando como *post-hoc* teste, o teste múltiplo de comparação de *Dunn*.

Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Todos os cálculos estatísticos e gráficos foram realizados utilizando os programas *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EUA*) e *Microsoft Excel 2000* (*Microsoft Co., EUA*).

4. RESULTADOS

4.1. Características gerais e resultados do teste cutâneo de puntura dos pacientes e indivíduos não atópicos do estudo

Os pacientes e indivíduos não atópicos analisados foram divididos em 3 grupos, de acordo com a positividade ao teste cutâneo de puntura (TCP) a extratos alergênicos de pólen: (1) Grupo RAS - pacientes com rinite alérgica sazonal e TCP positivo aos extratos de pólen testados; (2) Grupo RAP - pacientes com rinite alérgica perene e TCP negativo aos extratos de pólen, mas TCP positivo a pelo menos um dos extratos de ácaros testados. O grupo RAP foi constituído de dois subgrupos, um subgrupo de pacientes residentes em Caxias do Sul – RS (grupo RAP_{CS}) e outro de pacientes residentes em Uberlândia – MG (grupo RAP_{UDI}); (3) Grupo NA - indivíduos não atópicos, negativos no TCP aos extratos de pólen e ácaros. Todos os pacientes alérgicos e indivíduos não atópicos apresentaram reação positiva à histamina.

As características quanto a gênero, idade, diagnóstico clínico e resultado de TCP dos grupos estudados estão demonstradas na Tabela 1. O grupo RAS constituiu-se de 38 pacientes (14 homens e 24 mulheres) com idade média de $32 \pm 10,5$ anos (média de idade \pm DP). O grupo RAP_{CS} constituiu-se de 19 pacientes (6 homens e 14 mulheres) com idade média $23,7 \pm 10,9$ anos, enquanto o grupo RAP_{UDI} constituiu-se de 14 pacientes (6 homens e 8 mulheres) com idade média de $27 \pm 6,4$ anos. Já o grupo NA foi constituído de 30 sujeitos (11 homens e 19 mulheres) com idade média de $27 \pm 10,5$ anos.

Quanto à história clínica, rinite alérgica foi o diagnóstico clínico predominante nos grupos e subgrupos de pacientes atópicos (RAS, RAP_{CS} e RAP_{UDI}), não havendo

diferença significativa entre eles ($P > 0,05$). Entretanto, conjuntivite foi o diagnóstico clínico mais freqüente no grupo RAS (92%), diferença significativa em relação aos subgrupos RAP_{CS} e RAP_{UDI} ($P < 0,05$), sendo que dentro do grupo RAP foi observada conjuntivite somente no subgrupo RAP_{CS} (42%). Em contrapartida, nenhum caso de conjuntivite foi observado nos pacientes alérgicos a ácaros residentes em Uberlândia (RAP_{UDI}) e nos indivíduos não atópicos (NA).

No grupo RAS, o diâmetro médio da pápula (mm) no TCP ao extrato Lm (diâmetro médio de pápula \pm DP: $10,3 \pm 2,3$) foi maior que ao extrato GII ($5,0 \text{ mm} \pm 1,9$) ($P < 0,05$). A positividade no TCP aos extratos Lm e GII foi de 100% (Tabela 1), entretanto observamos uma diferença de reatividade dos pacientes aos dois extratos, uma vez que a maioria dos pacientes do grupo RAS apresentou diâmetro médio da pápula > 9 mm para o extrato Lm (68,4%) e entre 3 e 6 mm para o extrato GII (97,4%) (Tabela 2).

A positividade aos extratos de ácaros Dp, Df e Bt foi menor no grupo RAS (16 a 31,6%), do que nos subgrupos de pacientes RAP_{CS} (89,5 a 100%) e RAP_{UDI} (93,8 a 100%) ($P < 0,05$). O diâmetro médio de pápula aos extratos de ácaros foi maior no subgrupo RAP_{UDIA} do que no subgrupo RAP_{CS} , sem, no entanto, atingir nível de significância ($P > 0,05$). No grupo NA não foi observada nenhuma reatividade cutânea aos extratos de pólen e ácaros testados (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição por idade, sexo, história clínica e resultado de TCP (diâmetro médio de pápula e positividade) de pacientes com polinose e TCP positivo a extrato de pólen (grupo RAS), de pacientes atópicos e TCP negativo a extrato de pólen, mas positivo a extratos de ácaros da poeira domiciliar (subgrupos RAP_{CS} e RAP_{UDI}) e de indivíduos não atópicos (grupo NA). Positividade ao TCP foi determinada a partir do diâmetro médio de duas medidas perpendiculares da pápula formada e definida como > 3 mm em relação ao controle negativo da reação

Características	Grupos			
	RAS	RAP		NA
		RAP _{CS}	RAP _{UDI}	
Número de indivíduos (n)	38	19	16	30
Idade (anos)				
Média±desvio padrão	32 ± 10,5	23,7 ± 10,9	27 ± 7	27 ± 10,5
Sexo (Masculino/Feminino)	14/24	6/13	8/8	11/19
História Clínica (n, %)				
Rinite	38 (100%) ^a	19 (100%) ^a	15 (94%) ^a	0
Conjuntivite	35 (92%) ^a	8 (42%) ^b	0	0
Asma	1 (2,6%) ^a	2 (11%) ^a	2 (13%) ^a	0
Positividade ao TCP (mm, %) [§]				
<i>L. multiflorum</i>	10 ± 2,3 100 %	0 0	0 0	0 0
Gramíneas II	5 ± 1,5 100 %	0 0	0 0	0 0
<i>D. pteronyssinus</i> (Dp)	4 ± 1,1 ^a 31,6 % ^a	6 ± 2,0 ^b 100% ^b	9 ± 3,9 ^b 93,8% ^b	0 0
<i>D. farinae</i> (Df)	4 ± 1,45 ^a 16 % ^a	5 ± 1,9 ^{a,b} 89,5% ^b	8 ± 3,3 ^b 93,8% ^b	0 0
<i>B. tropicalis</i> (Bt)	5 ± 1,1 ^a 18,4% ^a	6 ± 2,3 ^a 94,7% ^b	6 ± 3,3 ^a 100% ^b	0 0

[§] Os dados estão representados como média ± desvio padrão do tamanho da pápula e porcentagem de positividade. ^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($P < 0,05$) pelo teste de *Kruskal Wallis*

Tabela 2. Número absoluto (n) e percentagem (%) de pacientes com rinite alérgica sazonal, grupo RAS (n=38), de acordo com diferentes graus de reatividade cutânea aos extratos de pólen de *L. multiflorum* (Lm) e Gramíneas II (GII) pelo teste cutâneo de puntura (TCP), tomando-se a média de dois diâmetros perpendiculares e adotando-se como critério de positividade ao teste o diâmetro médio > 3mm, em relação ao controle negativo da reação. Os diferentes graus de reatividade cutânea foram definidos arbitrariamente

Graus de reatividade cutânea ao TCP	Positividade a extratos de pólen de gramíneas	
	n (%)	
	Lm	GII
> 3 – 6 mm	1 (2,6)	29 (76,3)
> 6 – 9 mm	11 (29)	8 (21,1)
> 9 – 12 mm	20 (52,6)	1 (2,6)
> 12 mm	6 (15,8)	0 (0)

4.2. Ensaio imunoenzimático – ELISA, para detecção de IgE específica a alérgenos de pólen de *L. multiflorum*

Ensaio imunoenzimáticos (ELISA) foram empregados para a detecção dos níveis de IgE sérica específica a alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum* utilizando o extrato Lm, em amostras de soro dos três grupos de pacientes e indivíduos não-atópicos estudados. Para as análises das respostas anticórpicas, os subgrupos RAP_{CS} e RAP_{UDI} foram analisados como um único grupo (RAP) (Figura 2).

No grupo RAS, o valor médio de IgE sérica específica aos alérgenos contidos no extrato Lm foi de $11,4 \pm 4,07$ IE. Nos grupos RAP e NA os níveis de IgE sérica foram $0,95 \pm 0,49$ IE e $0,76 \pm 0,07$ IE, respectivamente. Níveis de IgE específica foram significativamente ($P < 0,001$) maiores no grupo RAS comparados aos dos grupo RAP e NA, porém não se observou diferença ($P > 0,05$) entre esses dois últimos grupos.

Todos os pacientes do grupo RAS foram positivos ao teste ELISA para detecção de IgE específica a alérgenos de pólen de *L. multiflorum*, enquanto que somente três (8,6%) pacientes do grupo RAP apresentaram positividade ao teste, porém com valores de IE baixos (2,3 IE e 3,2 IE) ou próximo (1,4 IE) ao critério de positividade adotado (IE = 1,2). Nenhum indivíduo do grupo NA apresentou reatividade a Lm no teste ELISA (Figura 2). Adicionalmente, para o grupo RAS o diâmetro médio de pápula no TCP ao extrato Lm não se correlacionou ($r_s = 0,1743$; $P > 0,05$) com os níveis de IgE sérica específica a alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum* determinados por ELISA (Figura 3).

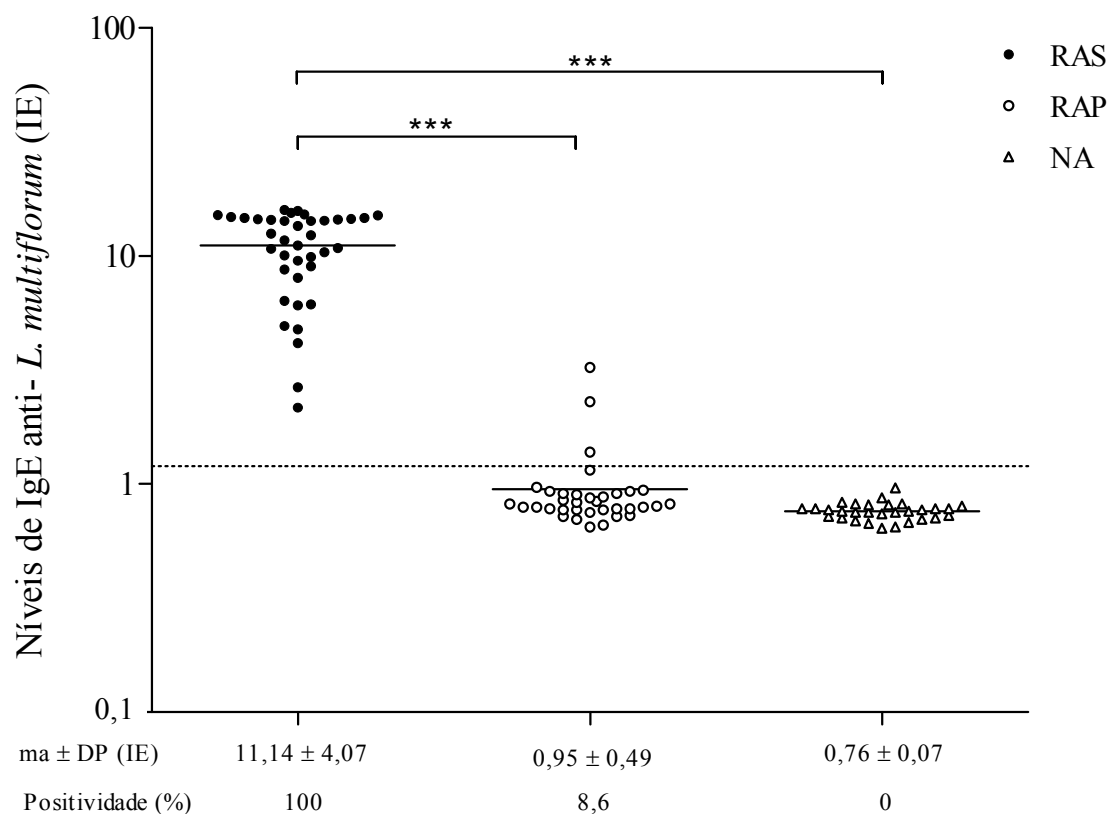


Figura 2. Níveis de IgE sérica específica a alérgenos do extrato de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm), determinados por ELISA e expressos em índice ELISA (IE) em amostras de soro de pacientes com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a Lm (RAS, $n = 38$), TCP negativo a Lm mas positivo a extratos de ácaros (RAP, $n = 35$) e indivíduos Não atópicos (NA, $n = 30$). A linha pontilhada indica o limiar de positividade do teste (IE = 1,2). As barras horizontais representam as médias aritméticas para cada grupo. Média aritmética (ma) e desvio padrão (DP), assim como positividade (%) estão também representados. *** $P < 0,001$

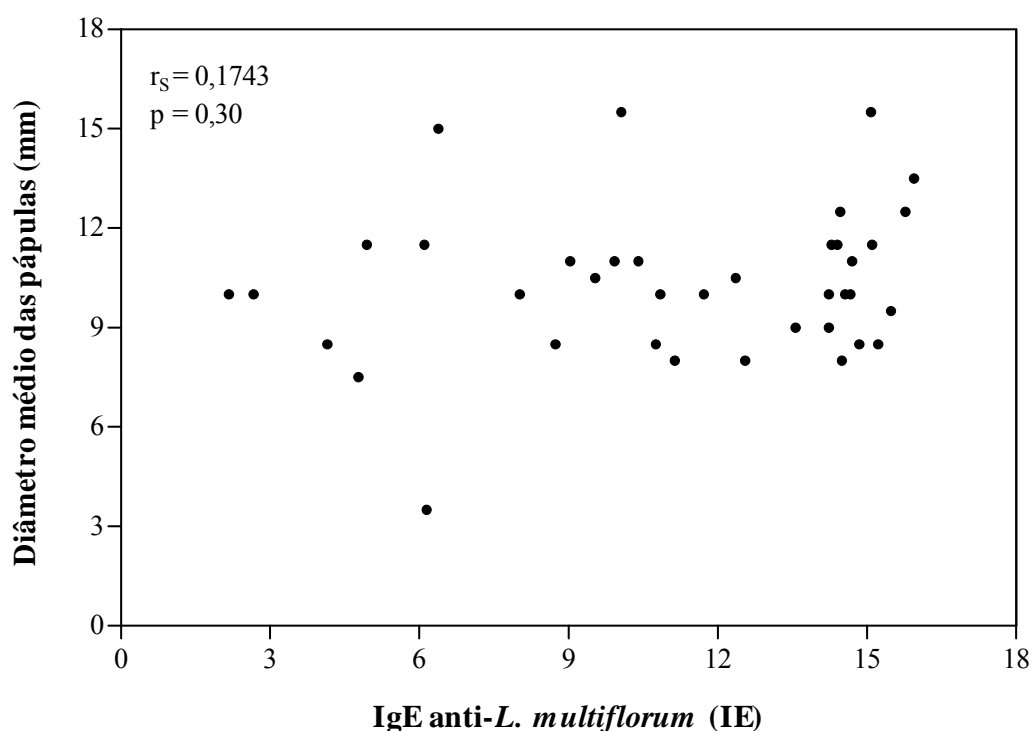


Figura 3. Correlação entre os níveis séricos de IgE específica a alérgenos de pólen de *L. multiflorum*, expressos em índice ELISA (IE) e o diâmetro médio de pápula (mm) obtido no teste cutâneo de puntura (TCP) ao extrato de *L. multiflorum* em pacientes com rinite alérgica sazonal (RAS, n = 38). O coeficiente de correlação (r_s) foi calculado pelo teste de correlação de *Spearman*

4.3. Ensaio de inibição competitiva por ELISA – IgE

Para a determinação da especificidade de IgE anti-*L. multiflorum* utilizou-se ensaio imunoenzimático ELISA de inibição competitiva empregando-se um *pool* de seis soros de pacientes do grupo RAS e como inibidores os extratos Lm, Lp, GI e GII. O extrato Bt foi utilizado como alérgeno irrelevante (Figura 4). A inibição pelo extrato homólogo Lm resultou em curva do tipo sigmóide dose resposta, atingindo inibição máxima na dose de 200 $\mu\text{g/mL}$, e uma percentagem de 50% de inibição (I_{50}) com uma dose de 12,3 $\mu\text{g/mL}$. Para os extratos heterólogos Lp e GII observou-se inibição de IgE anti-*L. multiflorum* no ELISA com uma concentração máxima de 200 $\mu\text{g/mL}$ e I_{50} em

concentrações de 190,5 $\mu\text{g/mL}$ e 197,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em relação aos extratos GI (inibição máxima 8%) e Bt não foi observada inibição relevante sobre reatividade de IgE anti-*L. multiflorum*.

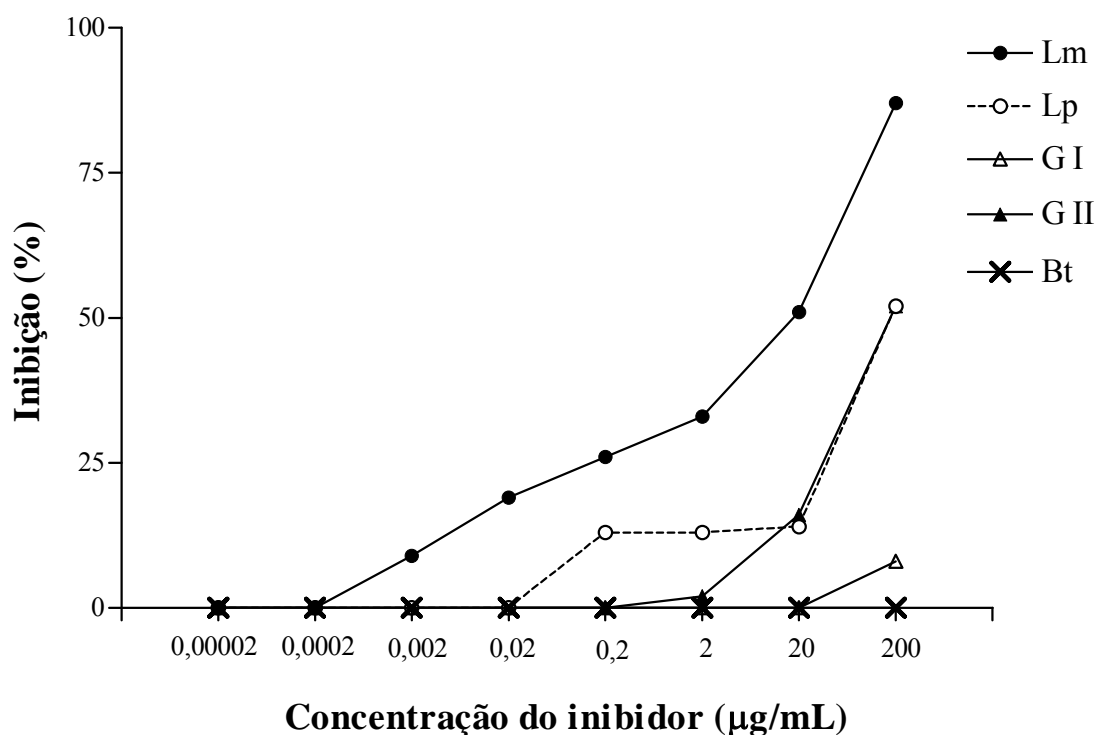


Figura 4. Curvas de inibição competitiva de IgE anti-*L. multiflorum* pelos extratos de *L. multiflorum* (Lm), *L. perenne* (Lp), Gramíneas I (GI), Gramíneas II (GII) e *B. tropicalis* (Bt, alérgeno irrelevante), por ELISA. Os inibidores foram submetidos a diluições decimais seriadas de 200 a 2×10^{-5} $\mu\text{g/mL}$ de proteínas, e incubados com um *pool* de 6 soros de pacientes do grupo RAS. As misturas antígenos-soro foram analisadas nos ELISAs para IgE anti-*L. multiflorum*. O soro incubado somente com diluente foi utilizado como controle positivo da reação

4.4. Identificação das frações alergênicas de Lm por *Immunoblotting*

Um amplo espectro de componentes alergênicos, variando de 14 a 116 kDa, presentes no extrato Lm foi reconhecido por anticorpos IgE específicos a pólen de *Lolium multiflorum* de pacientes do grupo RAS, por ensaios de *Immunoblotting*. Cento e três soros de pacientes e indivíduos não atópicos dos grupos RAS (n=38), RAP (n=35) e NA (n=30) foram testados. Soros representativos de cada grupo estão demonstrados na Figura 5A. Quatorze componentes alergênicos do extrato Lm, com massa molecular relativa de 14, 19-21, 23, 24, 26, 28, 32, 40, 55, 66, 72, 78, 84 e 96-116 kDa foram reconhecidos por anticorpos IgE de pacientes do grupo RAS.

As frações alergênicas imunodominantes foram as de 26 kDa (95%), 96 - 116 kDa (84%), 28 e 32 kDa (92%), 40 kDa (63%), 55 kDa (55%), 66 kDa (76%) e 72 kDa (68%). Outras frações também foram reconhecidas por IgE, porém em menor frequência, como demonstrado na Figura 5B. Foram elas as de 14 kDa (42%), 19 - 21 kDa (37%), 78 e 84 kDa (37%), 23 e 24 kDa (34%). Todos os 38 pacientes do grupo RAS reconheceram pelo menos 2 componentes antigênicos, enquanto que para os grupos RAP e NA, nenhum componente alergênico foi identificado por *Immunoblotting*.

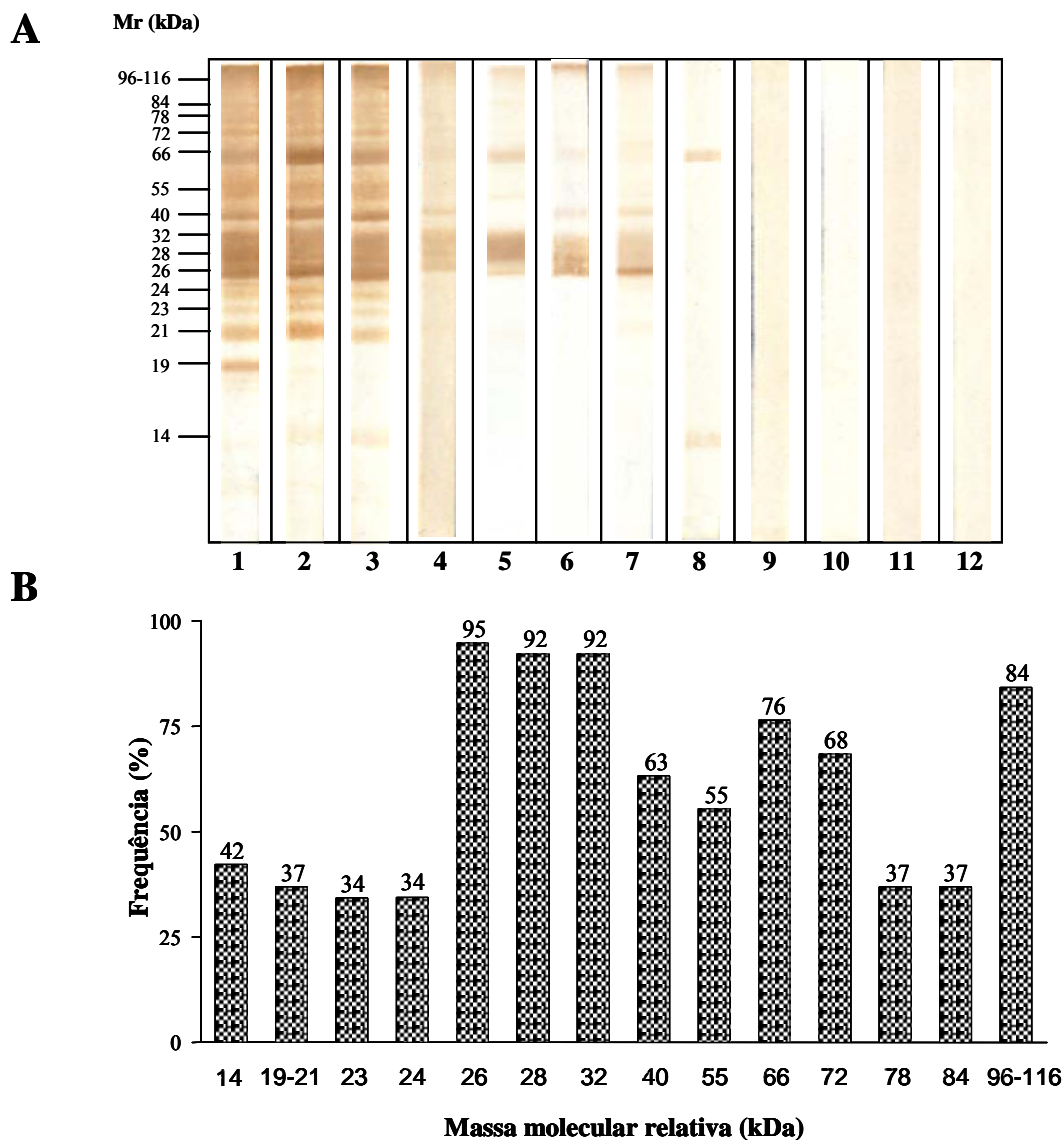


Figura 5. (A) *Immunoblotting* para detecção de frações alergênicas de Lm ligantes de IgE. Fitas de 1 a 8 representam reatividade do soro de pacientes do grupo RAS; fitas 9 e 10 representantes do grupo RAP e fitas 11 e 12 representantes do grupo NA. (B) Frequência (%) de componentes alergênicos contidos no extrato de pólen de *L. multiflorum* reconhecidos, através de *Immunoblotting*, por anticorpos IgE presentes nos soros de 38 pacientes com polinose do grupo de pacientes com rinite alérgica sazonal (RAS). Mr: Massa molecular (kDa)

4.5. *Immunoblotting* de inibição competitiva

Para a determinação da reatividade cruzada de IgE reativo a frações protéicas de Lm às frações de alérgenos existentes em extratos de pólenes de gramíneas cultivadas,

como Lp, GI e GII e do ácaro Bt foram realizados ensaios de *Immunoblotting* de inibição competitiva, nos soros de pacientes do grupo RAS. Imagens de reações de *Immunoblottings* de três pacientes do grupo RAS, com os diferentes inibidores, estão demonstradas na Figura 6. A amplitude das bandas testadas para inibição para todos os inibidores foi de 14 a 96-116 kDa. Para o inibidor homólogo (Lm) todas as bandas foram inibidas em uma percentagem acima de 80%. Observou-se uma alta percentagem de inibição (82,4 a 100%) em relação às oito frações protéicas imunodominantes (26, 28, 32, 40, 55, 66, 72 e 96-116 kDa). Foi possível observar que as frações de 14, 19-21, 23, 40, 55, 66 kDa apresentaram 100% de inibição homóloga (Figura 7A).

Avaliando-se a inibição realizada pelo extrato Lp viu-se que somente as bandas de 14 e 19-21 kDa apresentaram 100% de inibição, porém todas as outras bandas, inclusive todas as imunodominantes apresentaram inibição abaixo de 80%, sendo que as bandas imunodominantes apresentaram as menores percentagens de inibição. Analisando-se os valores de inibição em relação ao índice de inibição de 50% (I_{50}), dentre as bandas imunodominantes seis foram inibidas por Lp (28, 32, 40, 55, 66 e 72 kDa), porém as bandas de 26 e 96 – 116 kDa não apresentaram inibição significativa (Figura 7B).

Quando utilizou-se como inibidor o extrato GI, novamente 100% de inibição foi observada para as bandas de 14 e 19-21 kDa, e inibição significativa ocorreu também para as bandas 23 e 24 kDa, entretanto, dentre as frações imunodominantes, nenhuma inibição foi observada pelo mesmo extrato (Figura 7C). A inibição pelo extrato GII foi igual aos outros extratos em relação às frações de 14 e 19 – 21 kDa. Analisando as bandas imunodominantes, quando considerado o I_{50} , setes delas foram inibidas (26, 28, 32, 40, 55, 66, 72 kDa) (Figura 7B e 7D).

Levando-se em consideração as frações imunodominantes de 26 a 72 kDa, com o inibidor Lp somente a fração de 26 kDa não apresentou inibição, quando considerado o

I_{50} , enquanto que com o extrato GII todas as frações apresentaram inibições significativas quando analisadas sob o mesmo parâmetro (I_{50}).

Considerando arbitrariamente um índice de 80% de inibição (I_{80}), somente o extrato Lm apresentou inibição sobre todas as bandas imunodominantes, enquanto que, nenhuma banda foi inibida pelos extratos Lp e GI. Entretanto, o extrato GII demonstrou I_{80} apenas para a fração imunodominante de 55 kDa (81,3% de inibição).

As frações não imunodominantes de 14 e 29 - 21 kDa foram 100% inibidas por todos os extratos de pólen de gramíneas empregados como inibidores (Lm, Lp, GI e GII) (Figura 7A, 7B, 7C e 7D). Não se observou inibição significativa com o extrato Bt de nenhuma fração alergênica (dados não mostrados)

Dados de média e desvio padrão da percentagem de inibição das frações por cada extrato, estão demonstrados no APÊNDICE 1.

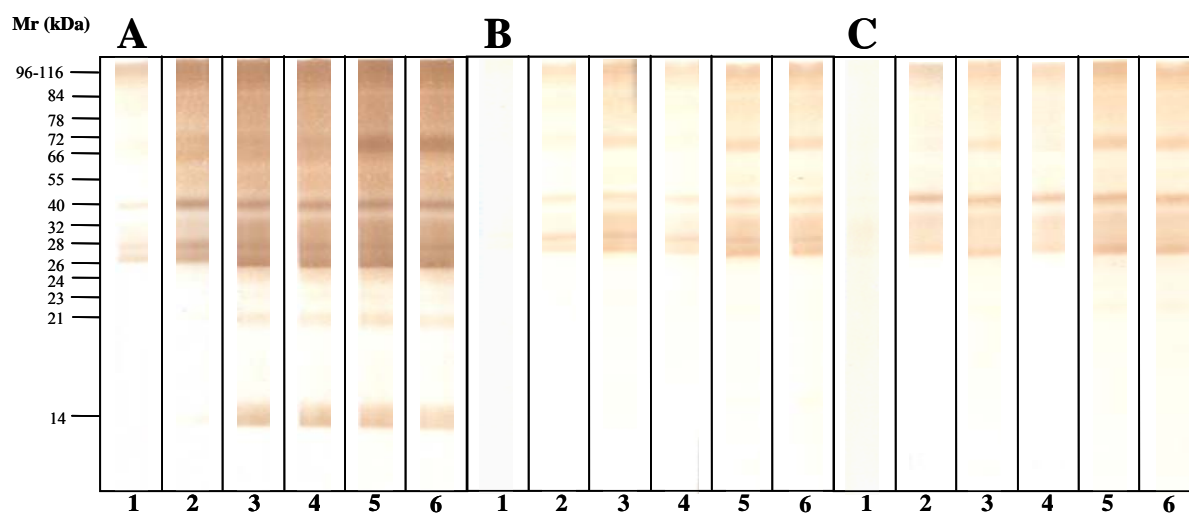


Figura 6. *Immunoblotting* de inibição competitiva para avaliar a especificidade de IgE anti- *L. multiflorum* em soros de pacientes do grupo RAS. **A**, **B** e **C** representam três soros testados. A numeração abaixo de cada fita representa o inibidor utilizado. Fitas 1, soro pré-incubado com extrato de *L. multiflorum*; fitas 2, soro pré-incubado com extrato de *L. perenne*; fitas 3, soro pré-incubado com extrato Gramíneas I; fitas 4, soro pré-incubado com extrato Gramíneas II; fitas 5, soro pré-incubado com extrato de *B. tropicalis* (alérgeno irrelevante); fitas 6, soro sem inibidor. Mr: Massa molecular relativa (kDa)

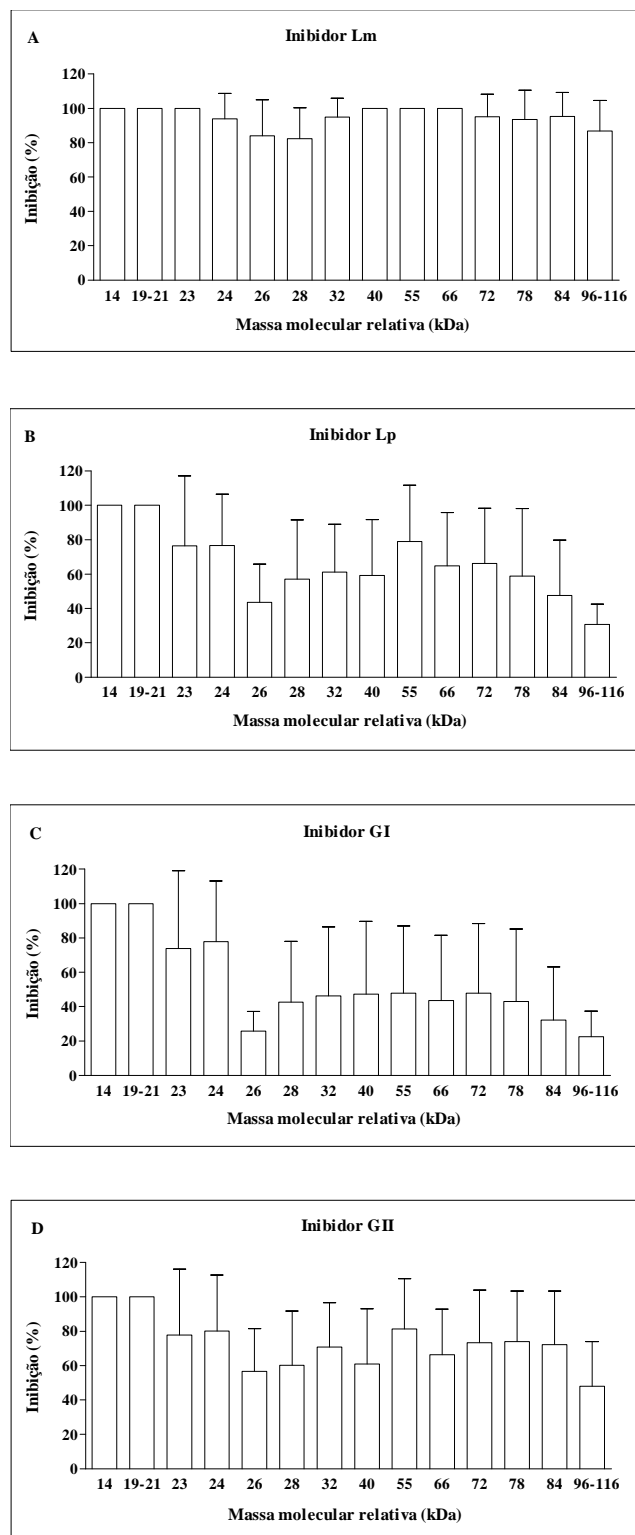


Figura 7. Percentagem (%) média de inibição de bandas alergênicas presentes no extrato de pólen de *L. multiflorum* (Lm) reconhecidas por anticorpos IgE anti- *L. multiflorum* no soro de pacientes com rinite alérgica sazonal (grupo RAS). Foram utilizados como inibidores extratos de pólen de (A) *L. multiflorum* (Lm), (B) *L. perenne* (Lp), (C) Gramíneas I (GI), (D) Gramíneas II (GII) na concentração de 200 µg/mL. Dados representam a média e o desvio padrão das percentagens de inibição obtidas a partir de 10 soros testados individualmente, por *immunoblotting*

5. DISCUSSÃO

Pólens de gramíneas têm sido considerados uma importante fonte alergênica, sendo uma causa comum de morbidade e grande perda econômica (LOVBORG et al., 1999), entre eles pólen de *L. perenne*, têm mostrado importância clínica na doença alérgica polínica, entretanto outros pólen de gramíneas podem ser prevalentes e clinicamente relevantes em determinadas regiões (SCHUMACHER; GRABOWSKI; WAGNER, 1985; LICCARDI et al., 1996; BASS et al., 2000; DAVIES et al., 2005). Entre as diferentes espécies de gramíneas, os grãos de pólen de *Lolium multiflorum* têm sido considerados responsáveis por reações alérgicas em áreas de ocorrência dessa gramínea (VIEIRA; FERREIRA; MATTER, 2005).

Alguns estudos desenvolvidos no Brasil, restritos à região Sul que relataram a existência de polinose, são baseados em questionários clínicos e em testes cutâneos, empregando extratos de pólen de gramíneas diversas, muitas delas não cultivadas ou presentes na região. Sopelete et al. (2006) relataram a existência de reatividade cruzada e do grau de alergenicidade entre extratos de pólen de gramíneas e *L. multiflorum*, mas não determinaram as frações alergênicas de reatividade cruzada. Porém, muito se publicasobre esta relação das gramíneas da família Poaceae, entre elas, principalmente *L. perenne* e *Phleum pratense*, relacionadas filogeneticamente a *L. multiflorum* (VAN REE et al., 1995; SUPHIOGLU et al., 1999; LAFFER et al., 1994; SUPHIOGLU, 2000; WEBER, 2003). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo principal apresentar o perfil de reatividade IgE-específico aos alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum* e analisar a reatividade cruzada destes com os de pólen de gramíneas empregados no diagnóstico e imunoterapia da polinose no Sul do Brasil .

A seleção dos pacientes e indivíduos participantes do estudo foi baseada na avaliação clínica e no TCP. Rinite alérgica foi o diagnóstico mais frequentemente observado, tanto no grupo de pacientes com polinose caracterizada por rinite alérgica sazonal (grupo RAS) quanto no grupo de pacientes atópicos com rinite alérgica perene a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar (grupo RAP). Entretanto, significativa frequência de conjuntivite foi observada somente nos pacientes com polinose (grupo RAS). Característica descrita por Rosário Filho (1983) e também verificado por Sopelete et al. (2006) e Moreira (2006) que observaram conjuntivite em maior frequência em pacientes com polinose. Assim, esses estudos demonstram a importância da conjuntivite, associada ou não a rinite, na doença alérgica polínica, uma vez que os alérgenos do grão de pólen ao entrarem em contato com a mucosa nasal e conjuntiva ocular podem desencadear sintomas relacionados à rinoconjuntivite alérgica (DUTRA; ROSÁRIO FILHO; ZAVADINIAK, 2001) e que sintomas na conjuntiva podem ser observados já nos estágios iniciais da estação de polinização de gramíneas (LIPIEC et al., 2005).

Pacientes com rinite alérgica perene a ácaros da poeira domiciliar, residentes em Caxias do Sul (RAP_{CS}) também apresentaram sintomas de conjuntivite, embora em menor frequência (42%) que os pacientes com polinose (92%). Por outro lado, pacientes com rinite alérgica perene a ácaros da poeira domiciliar, residentes em Uberlândia (RAP_{UDI}) não apresentaram conjuntivite. Fato semelhante foi relatado em estudo anterior com pacientes atópicos dessas duas cidades, onde quadros de conjuntivite foram observados em pacientes atópicos de Caxias do Sul, mas não de Uberlândia (MOREIRA, 2006). A frequência de conjuntivite pode estar associada diretamente à presença de pólen no ar da cidade de Caxias do Sul no período de polinização, uma vez que os pacientes que apresentaram conjuntivite alérgica (tanto do grupo RAS como do

subgrupo RAP_{CS}) eram moradores dessa cidade, onde *L. multiflorum* é cultivada ou está presente como invasora nos terrenos baldios da cidade. Já a ausência de casos de conjuntivite em Uberlândia reflete a ausência de pólen dessa e de outras gramíneas que poderiam estar contribuindo com os casos de irritação e inflamação da conjuntiva. Assim, esses dados em conjunto demonstram que as condições ambientais e de exposição à alérgenos de pólen de gramíneas na cidade de Caxias do Sul poderiam estar relacionadas com o conseqüente comprometimento ocular contribuindo com os casos de conjuntivite observados, tanto em pacientes com polinose, como em alguns casos de pacientes atópicos a ácaros da poeira domiciliar.

O TCP foi o principal parâmetro utilizado para a seleção dos pacientes participantes do estudo. Sendo assim, todos os pacientes incluídos no grupo RAS apresentaram alta concordância de resultados positivos ao TCP utilizando extrato Lm e extrato comercial Gramíneas II (GII), o qual é rotineiramente utilizado no diagnóstico e na imunoterapia da polinose no Sul do Brasil. No entanto, ao TCP maiores diâmetros médio de pápula e reatividade cutânea (a maioria dos pacientes apresentou pápula > 9 mm a Lm) foram observados para o extrato Lm quando comparado ao extrato GII. Fato semelhante foi observado em estudo recente desenvolvido por Sopelete et al. (2006), e assim isto confirma observações anteriores, sugerindo que o extrato Lm seja mais sensível para ser utilizado no referido teste, principalmente em análises quantitativas, visto ser constituído de proteínas específicas do grão de pólen dessa espécie de gramínea. Ao contrário, o extrato comercial GII é composto por alérgenos de grãos de pólen de *L. perenne* e de gramíneas que não estão presentes em larga escala na região estudada, mas que apresentam uma grande homologia e reatividade cruzada com alérgenos de pólen de outras gramíneas da mesma família e subfamília (FAHLBUSCH et al., 1998; WEBER, 2003). Deve-se ressaltar que a diferença significativa dos diâmetros médios de

pápulas encontrada entre os extratos de pólen GII e Lm pode ainda estar relacionada à potência alergênica dos extratos, uma vez que apresentam 10.150 UBE/mL e 1 mg/mL, respectivamente e que nenhum estudo para ajustá-las foi previamente realizado.

Por outro lado, na região Sul, existem várias outras gramíneas, entre elas *C. dactylon* e *P. notatum* (subfamílias Chloridoideae e Panicoideae, respectivamente), cujos alérgenos de pólen apresentam menor reatividade cruzada com as espécies das gramíneas, membros da subfamília Pooideae e que não estão contidas no extrato Gramíneas II (WEBER, 2003). Assim, o uso de um extrato alergênico contendo alérgenos de pólen relevantes da região deveria ser considerado no TCP, principalmente nos casos em que se necessita de resultados quantitativos mais precisos, como nas avaliações clínicas antes, durante e após imunoterapia específica a alérgenos de pólen de gramíneas.

Alérgenos de ácaros, particularmente das espécies *Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinae*, são importantes agentes sensibilizantes, particularmente na asma e rinite alérgicas, em regiões de clima temperado (PLATTS-MILLS et al., 1992) enquanto, aliado a eles, *B. tropicalis* é um ácaro importante, em termos de alergia respiratória, em países de clima tropical e subtropical como o Brasil (ARRUDA et al., 1991; GELLER; ESCH; FERNANDEZ-CALDAS, 1993; RIZZO et al., 1993; SARINHO et al., 1996).

No presente estudo, a sensibilização a ácaros foi mais freqüente nos pacientes que não apresentavam polinose (RAP_{CS} e RAP_{UDI}), sugerindo que os pacientes com rinoconjuntivite alérgica sazonal (grupo RAS) apresentavam história clínica, principalmente de conjuntivite, relacionada à exposição à alérgenos de pólen de gramíneas e não a ácaros.

Por outro lado, a alta positividade no TCP a extratos de ácaros em pacientes do grupo RAP reflete a importância desses alérgenos na sensibilização dos pacientes

atópicos desse grupo. Assim, as semelhantes taxas de positividade no TCP entre pacientes do grupo RAP, selecionados em Caxias do Sul e Uberlândia, sugerem que a sensibilização a alérgenos de ácaros parece ser similar nessas duas distantes regiões geográficas.

A sensibilidade a alérgenos ou extratos pode ser definida por diferentes critérios. A presença de um teste cutâneo positivo, bem como, níveis significativos de IgE sérica específica, têm sido empregados como diferentes indicadores de sensibilização em pacientes atópicos (DREBORG, 1993; TUNNICLIFFE et al., 1999; ESTEVES et al., 1999), tanto no período como fora do período de polinização (SOPELETE et al., 2006). Juntamente com o TCP, o ensaio imunoenzimático ELISA pode ser utilizado para a confirmação do diagnóstico de alergia *in vitro*, conforme relatado por Sopelete et al. (2006) que demonstraram ser o ELISA para detecção de IgE específica a alérgenos de pólen de *L. multiflorum* útil na avaliação a resposta de IgE, tanto no diagnóstico como na avaliação clínica quando da necessidade de análise quantitativa mais precisa.

Desta forma, o extrato Lm foi empregado no ELISA indireto para quantificação de anticorpos específicos a alérgenos de pólen de *L. multiflorum* (ELISA-Lm). Os significantivos níveis de IgE específica a Lm (IgE-Lm) e a alta positividade do teste no grupo RAS sugerem que ELISA-Lm pode ser empregado na avaliação da resposta IgE a alérgenos de pólen de *L. multiflorum*. A grande maioria dos pacientes com polinose (grupo RAS) apresentou níveis altos de IgE-Lm, sendo que somente dois pacientes apresentaram baixos índice ELISA de 2,17 e 2,66 IE. Aliado a isso, a baixa positividade ao ELISA-Lm observada no grupo RAP demonstra a alta especificidade do teste, uma vez que os níveis de IgE-Lm dos pacientes atópicos a ácaros da poeira domiciliar foram baixos ou próximo ao critério de positividade adotado (IE = 1,2). Possivelmente, esses pacientes (um de Caxias do Sul e dois de Uberlândia) estavam em fase inicial de

sensibilização (AALBERSE; AKKERDAAS; VAN REE, 2001) ou não estavam primariamente sensibilizados a pólen de *Lm*, mas sim a alérgenos de pólenes de outras gramíneas relacionadas a *L. multiflorum* presentes na região onde os mesmos residiam (SOPELETE et al., 2006), refletindo assim uma possível presença de IgE clinicamente irrelevante (AALBERSE; AKKERDAAS; VAN REE, 2001; ROSÁRIO FILHO, 2002) originada da reatividade cruzada entre alérgenos de pólen de gramíneas (WEBER 2003).

A presença de IgE específica nem sempre pode ser diagnosticada como alergia clínica, uma vez que reatividade cruzada entre epítomos homólogos, expressos em diferentes alérgenos, foi identificada como uma das principais razões para a presença de IgE clinicamente irrelevante (AALBERSE; AKKERDAAS; VAN REE, 2001), o que pode ocorrer principalmente devido à valência e baixa afinidade desses epítomos aos anticorpos IgE (EBO et al., 2004). Rosário Filho (2002) já havia descrito a presença da IgE clinicamente irrelevante em alguns pacientes asmáticos na cidade de Curitiba. O autor observou que 16,5 % dos pacientes asmáticos apresentaram reação positiva ao TCP a extrato de pólen de *L. perenne*, sem ocorrência de doença clínica na estação de polinização das gramíneas, indicando que essa positividade refletiria unicamente a presença de IgE específica, e não implicando em relevância clínica como causa de sintomas.

Assim, tomados em conjunto, esses dados indicam que a determinação dos níveis de IgE específica a alérgenos de pólen de gramíneas, particularmente empregando-se o extrato *Lm*, mostrou ser uma ferramenta útil na avaliação da resposta de IgE a alérgenos de pólen de *L. multiflorum* em pacientes com polinose, sendo indicada quando da necessidade de uma análise, quantitativa e mais precisa, da sensibilização de pacientes com polinose.

A reatividade cruzada é um fenômeno bem conhecido na imunologia e nas doenças alérgicas. Para avaliar a reatividade cruzada de IgE-Lm a alérgenos de extratos de pólen de outras gramíneas usualmente empregados no diagnóstico e na imunoterapia específica, utilizou-se ensaios imunoenzimáticos ELISA de inibição competitiva. Inibições homólogas e heterólogas significantes na detecção de IgE específica a alérgenos de pólen de *L. multiflorum*, refletem a existência de reatividade cruzada entre alérgenos desta gramínea com alérgenos dos extratos de Lp e GII, sendo que o mesmo não foi observado para o extrato GI. Adicionalmente, os valores de I_{50} com os extratos Lp e GII foram extremamente altos (190,5 $\mu\text{g/mL}$ e 197,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) comparados com o do extrato homólogo Lm (12,3 $\mu\text{g/mL}$). Sopelete et al. (2006) também observaram reatividade cruzada de alérgenos de pólen de Lm com aqueles contidos nos extratos Lp e GII. Entretanto, quanto a inibição na detecção de IgE-Lm esses mesmo autores relataram valores de I_{50} relativamente semelhantes entre os extratos Lm e Lp, mas 7,2 vezes maior com o extrato GII, refletindo alto grau de reatividade cruzada entre os alérgenos presentes principalmente, nos extratos Lm e Lp.

Diferenças nos dois estudos entre as concentrações para inibição de IgE-Lm de um mesmo extrato de pólen (Lp ou GII) podem estar associadas a vários fatores intrínsecos às gramíneas, aos extratos e aos pacientes analisados como: a carga alergênica variável entre espécies; diferentes formas de cultivo e de ambiente; métodos de extração alergênica e estabilidade dos extratos; diferença de reatividade dos pacientes escolhidos nos ensaios de inibição e mesmo na diferença na concentração dos principais alérgenos contidos em um mesmo extrato (ARILLA et al., 2001; DAVIES et al., 2005; MARTH et al., 2004; MISTRELLO et al., 2002; NIEDERBERGER et al., 1998; NIEMEIJER et al., 1996).

Marth e colaboradores (MARTH et al., 2004) demonstraram diferentes concentrações de alérgenos do grupo 2 de pólen em 10 espécies de gramíneas das tribos Aveneae, Poeae e Triticeae, da família Poaceae, onde alérgenos do grupo 2 não foram detectados em pólen de *C. dactylon*, mas variaram de 0,4% a 1,9% em relação à proteína total em *Hordeum vulgare* e *Poa pratensis*, respectivamente. Já em extratos padronizados de pólen de *Phleum pratense* de quatro diferentes empresas, os mesmos autores determinaram de 0,05 % a 0,4 % de alérgeno do grupo 2. Essas variáveis concentrações demonstram que extratos contendo pólenes de várias espécies de gramíneas poderiam ter alta concentração de um mesmo alérgeno o que poderia inadvertidamente causar reações adversas ou em caso (WEBER, 2003) contrário, ter sua potência alergênica ou biológica alterada (ESCH, 2006; VALENTA; NIEDERBERGER, 2007).

A inexpressiva reatividade cruzada entre os alérgenos de pólen dos extratos Lm e GI contrasta com a evidente identidade alergênica entre Lm, GII e Lp. Este padrão pode ser justificado em parte pela proximidade filogenética entre as gramíneas *L. multiflorum*, *L. perenne* e gramíneas do extrato GII (WEBER 2003), todas gramíneas da tribo Poeae, exceto *Phleum pratense* da tribo Aveneae presente no extrato GII. Já o extrato GI apresenta em sua composição pólenes de gramíneas da tribo Aveneae e principalmente da tribo Triticeae. Fato interessante a ser observado é que pólen de *Phleum pratense*, um representante da tribo Aveneae, está presente no extrato GII, e que um dos quatro pólenes de gramíneas presentes no extrato GI, *Avena sativa*, é também da tribo Aveneae. Assim a escolha de um extrato alergênico a ser utilizado, tanto no diagnóstico como na imunoterapia, não deve estar centrada somente na proximidade filogenética das espécies contidas no extrato com aquela a que os pacientes estão primariamente sensibilizados, uma vez que como já comentado anteriormente, a potência dos extratos alergênicos esta

sob influencia de vários fatores e não só da presença de pólenes de uma ou mais espécies de gramíneas presentes no extrato.

Em geral, estudos sobre a caracterização dos principais alérgenos de *L. multiflorum* são escassos. Contudo, há vários estudos relacionados à caracterização e sensibilização alérgica de pólenes de *L. perenne* e outras gramíneas da mesma família de *L. multiflorum* (FREIDHOFF et al., 1986; LOVBORG et al., 1999).

Eletroforese (SDS-PAGE) e imunoeletroforese (*Immunoblotting*) têm contribuído com a análise de extratos de pólen de gramíneas, visto que permitem a identificação do número e da frequência de ligação de anticorpos IgE aos componentes antigênicos, presentes nos extratos alérgicos. Segundo Suphioglu (2000) através de SDS-PAGE, seguida de coloração com Coomassie Blue, podem ser observadas de três a mais de 30 bandas protéicas, dependendo do pólen da gramínea analisada. No presente trabalho 14 frações protéicas presentes no extrato Lm foram identificadas por SDS-PAGE variando de 14 a 116 kDa. Este achado está em concordância com Ford; Baldo (1986) que identificaram em extrato bruto de *L. perenne* 14 componentes variando de 14 a 80 kDa.

Todas as frações antigênicas presentes no extrato de pólen de *L. multiflorum* evidenciadas ao SDS-PAGE mostraram capacidade de ligação a IgE presente no soro de pacientes com polinose por *Immunoblotting*. Em relação à frequência de componentes antigênicos do extrato Lm ligantes de IgE de pacientes do grupo RAS através de *Immunoblotting*, as frações mais reconhecidas (> 50%) foram as de 26, 96 - 116, 28, 32, 40, 55, 66 e 72 kDa. Outras frações (14, 19-21, 23, 24, 78 e 84 kDa) mostraram importância secundária. Os principais componentes, que apresentaram mais de 92% de frequência de reconhecimento por IgE foram as frações de 26, 28 e 32 kDa. Frações de massa molecular de 28-30 e 31-34 também foram imunodominantes em estudo desenvolvido por Sopelete et al. (2006) em pacientes com polinose. Estes achados estão

em concordância com os relatados por Sing; Knox (1985) e Schäppi et al. (1999) que detectaram alérgenos de pólen dos grupos 1 constituído de glicoproteínas de 32-35 kDa e grupo 5 de proteínas não glicosiladas de 28-30 kDa, como os mais freqüentes reconhecidos por pacientes alérgicos a pólen de gramíneas.

No extrato Lm os componentes antigênicos de 55 e 66 kDa foram reconhecidos por anticorpos IgE da maioria dos pacientes com polinose, da mesma forma que estudo de Sopelete et al. (2006) em pacientes com alergia a pólen de *L. multiflorum*. Devido a sua freqüência de reconhecimento e massa molecular aparente esse componente pode estar relacionado aos alérgenos dos grupos 4 e 13. Vários estudos demonstraram a importância clínica dos alérgenos dos grupos 4 e 13 de pólen de gramíneas (FAHLBUSCH et al., 1998; SUCK et al., 2000). Em extrato de pólen de *L. perenne*, Ekramoddoullah; Kisil; Sehon (1983) caracterizaram Lol p 4 como uma proteína de 59 kDa, enquanto que para *P. pratense*, Fahlbusch et al. (1998), mostraram que Phl p 4 apresenta uma massa molecular de 55 kDa. Entretanto, alérgenos dos grupos 4 e 13 podem ser discriminados através de gel bidimensional seguido de *Immunoblotting*, uma vez que apresentam pontos isoelétricos (pI) diferentes, como os descritos para Phl p 4, glicoproteína e pI de 9,4 e para Phl p 13, glicoproteína e pI de 7,5 (FAHLBUSCH et al., 1998; SUCK et al., 2000).

Em relação aos componentes antigênicos de massa molecular de 96–116 kDa pode-se observar uma alta percentagem (84%) de reconhecimento pelos soros de pacientes do grupo RAS. Entretanto nenhum componente de alta massa molecular foi descrito ser ligante de IgE de pacientes alérgicos a pólen de *L. perenne*, em *Immunoblotting* sob condições redutoras (FORD; BALDO, 1986; EKRAMODDOULLAH; KISIL; SEHON, 1983). Porém, Ford; Baldo (1987) relataram para *C. dactylon* que o componente antigênico de 100 kDa foi clinicamente importante. *C. dactylon*, subfamília

Chloridoideae, esta presente na região Sul do Brasil. Assim, a reatividade as frações 96-116 kDa de *L. multiflorum* sugere uma provável reatividade cruzada com componentes de alta massa molecular de *C. dactylon* (FORD; BALDO, 1986; EKRAMODDOULLAH; KISIL; SEHON, 1983). Novos estudos utilizando anticorpos monoclonais específicos ou imunoenaios de inibição poderão elucidar essa questão.

Sugere-se que o componente antigênico de baixa massa molecular de 14 kDa, reconhecido por 42% dos pacientes do grupo RAS, possa estar relacionado aos alérgenos dos grupos 2, 3, 10 ou 11 que apresentam massa molecular variando de 10 a 16 kDa. Alérgenos dos grupos 2 e 3, foram anteriormente identificados como proteínas de aproximadamente 10-12 kDa (ANSARI; SHENBAGAMURTHI; MARSH, 1989) com diferentes pontos isoelétricos, um ácido outro básico, podendo assim serem discriminados em gel bidimensional e mesmo quantificados por técnica utilizando anticorpo monoclonal (MARTH et al., 2004), enquanto que os alérgenos dos grupos 10 (\cong 12 kDa) e 11 (\cong 16 kDa) também podem ser diferenciados por seus diferentes pontos isoelétricos de 10 e 5-6, respectivamente (ANSARI; KILLORAN; MARSH, 1987; ANDERSON; LIDHOLM, 2003).

Estudos têm sido realizados para elucidar a existência de reatividade cruzada entre alérgenos de pólenes de gramíneas, inclusive não só em relação a extratos brutos, mas quanto à caracterização e clonagem de numerosas proteínas alergênicas (WEBER, 2003; AALBERSE; AKKERDAAS; VAN REE, 2001). Estudos de radioimunoensaio (RAST) de inibição, com extratos brutos de pólenes de gramíneas da subfamília Pooideae, demonstraram forte reatividade cruzada entre seus membros (BERSTEIN et al., 1976; MARTIN; MANSFIELD; NELSON, 1985; WEBER, 2003).

No presente estudo, significantes inibições homólogas e heterólogas foram observadas pelos extratos de gramíneas analisados, quanto a ligação de IgE as frações

alergênicas de pólen de *L. multiflorum*. Assim, nos ensaios de *Immunoblotting* de inibição, altíssima inibição (> 80%) homóloga foi observada em todas as frações de pólen de Lm, inclusive nas imunodominantes. Esses dados condizem com o esperado, visto que os pacientes eram primariamente sensibilizados ao pólen de *L. multiflorum*. Os inibidores Lp e Gramíneas II apresentaram capacidade de inibição I₅₀ praticamente em todas as frações imunodominantes de Lm. Vários estudos já demonstraram quanto aos alérgenos imunodominantes dos grupos 1 e 5, serem os mesmos altamente conservados na maioria das gramíneas clinicamente relevantes (JOHNSON; MARSH, 1966; SUPHIOGLU; SINGH; KNOX, 1993; BROADWATER et al., 1993; MATTHIESEN; SCHUMACHER; LOWENSTEIN, 1991). Contudo, as frações de massa molecular entre 28-32 kDa, relativas aos grupos 1 e 5, em média apresentaram inibição > 50% com os extratos Lp e Gramíneas II e inibição não significativa em relação ao extrato Gramíneas I. Sendo assim, observou-se limitada reatividade cruzada entre Lm e Gramíneas I, em contraste com a evidente identidade alergênica entre Lm, Gramíneas II e Lp. Este padrão pode ser justificado pela proximidade filogenética entre *L. multiflorum*, *L. perenne* e gramíneas do extrato Gramíneas II (WEBER, 2003).

No único estudo comparativo entre o reconhecimento de frações de pólen de *L. multiflorum* e de outras gramíneas disponível até o momento na literatura, Schäppi et al. (1999), relataram que o anticorpo monoclonal 1D11, específico ao alérgeno Phl p 5, reconheceu a fração antigênica de 30 kDa em muitos pólenes de gramíneas, inclusive de *L. perenne* e *L. multiflorum*, demonstrando a identidade alergênica dessa fração entre espécies de gramíneas diversas.

Os inibidores Lp e Gramíneas II apresentaram capacidade de inibição I₅₀ praticamente em todas as frações imunodominantes de Lm, exceto na de 26 kDa. Uma vez que essa fração teve uma I₅₀ significativa com o extrato homólogo Lm, mas fracas

inibições com extratos de pólen heterólogos (Lp, Gramíneas I e Gramíneas II) supõem-se tratar-se de um componente antigênico específico de Lm.

Altíssima inibição ($> I_{80}$) heteróloga foi observada somente em relação a banda de 55 kDa (possivelmente alérgenos dos grupos 4 ou 13) com o extrato Gramíneas II, mas com uma menor, porém ainda significativa inibição de aproximadamente 79% com o extrato Lp, sugerindo ser esta uma importante fração de reatividade cruzada entre alérgenos de pólen de *L. multiflorum* e das gramíneas presentes nos extratos Lp e GII. Vale a pena ressaltar que os extratos Lp e Gramíneas II não são constituídos de alérgenos de *L. multiflorum*, mas sim de alérgenos de pólen com proximidade filogenética a *L. multiflorum*, enquanto que o extrato Gramíneas I (que não demonstrou inibição significativa a nenhum componente antigênico imunodominante de Lm) apresenta em sua composição pólen de gramíneas de tribos (Triticeae e Aveneae) diferentes de *L. multiflorum* (Poeae).

Em conjunto, esses resultados estão de acordo com estudos de radioimunoensaio (RAST) de inibição e ELISA de inibição, com extratos brutos de pólen de gramíneas da subfamília Pooideae que demonstraram forte reatividade cruzada entre seus membros (BERSTEIN et al., 1976; MARTIN; MANSFIELD; NELSON, 1985; WEBER, 2003; SOPELETE et al., 2006; LOVBORG, 1999; MOHAPATRA, LOCKEY; SHIRLEY, 2005).

Entretanto, apesar de se conhecer a ocorrência de alta reatividade cruzada entre extratos de pólen de diferentes espécies de gramíneas, alérgenos específicos a uma espécie ou subfamília podem ter um papel importante na sensibilização de determinados indivíduos, sendo que nesses casos, deve se ter muita precaução para se considerar a reatividade cruzada entre alérgenos de pólen de gramíneas. É o caso dos alérgenos de pólen de *P. notatum* que mostraram limitada reatividade cruzada com alérgenos de *L.*

perenne em pacientes sensíveis a este pólen, conforme relatado por Davies et al. (2005), que concluíram então que deve-se considerar a utilização do extrato de *P. notatum* para o diagnóstico e tratamento de pacientes, com sintomas relacionados à época de florescimento desta gramínea.

Aliado a isso, já se demonstrou que extratos alergênicos contendo quantidades indefinidas de antígenos não alergênicos pode não apresentar a mesma resposta nos pacientes, quando comparado com extratos contendo alérgenos específicos uma vez que sua potência biológica pode ser perdida devido a grande variabilidade de antígenos (VALENTA; NIEDERBERGER, 2007). Assim, a reatividade cruzada entre alérgenos de pólenes de gramíneas deve ser bem avaliada, pois apresenta extrema importância na formulação dos extratos alergênicos podendo assim inadvertidamente levar à reações adversas, especialmente nos extratos contendo pólenes de várias espécies de gramíneas, que ao final da preparação podem conter uma alta concentração de um mesmo grupo de alérgeno (WEBER, 2003).

Assim, os dados deste estudo permitem concluir que extrato de pólen de *L. multiflorum* deve ser preferido a aqueles de pólen de gramíneas a ela relacionadas em análises quantitativas da sensibilização alérgica em pacientes com polinose devido a pólen de *L. multiflorum*, apesar da conhecida reatividade cruzada entre alérgenos de pólen de gramíneas. Aliado a isso, as bandas imunodominantes de pólen de *L. multiflorum* foram as de maior reatividade cruzada com alérgenos de pólen de *L. perenne* e de gramíneas do extrato Gramíneas II, particularmente a fração de 55 kDa e que a mesma poderá ser empregada no diagnóstico e imunoterapia específica quando da necessidade de se utilizar uma fração mais conservada entre pólenes de gramíneas da tribo Poaceae.

6. CONCLUSÕES

1. Maiores diâmetros médios obtidos no teste cutâneo de puntura (TCP) com o extrato de pólen Lm em relação do extrato comercial Gramíneas II sugerem que o extrato Lm seja mais sensível para ser utilizado em análises quantitativas, tanto no diagnóstico como na imunoterapia específica, em pacientes com polinose sensíveis a pólen de *Lolium multiflorum*, devido o extrato Lm ser constituído de proteínas específicas do grão de pólen dessa espécie de gramínea.

2. A determinação dos níveis de IgE específica ao alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum*, por ELISA, mostrou ser uma ferramenta útil na avaliação da resposta anticórpica à alérgenos de pólen de *L. multiflorum* em pacientes com polinose, principalmente quando da necessidade de uma análise quantitativa e mais precisa.

3. Significantes inibições homólogas e heterólogas observadas nos ELISAs de inibição, para detecção de reatividade cruzada de IgE específica a alérgenos de pólen de contidos no extrato Lm, refletem uma significativa reatividade cruzada entre alérgenos de pólen contidos neste extrato com alérgenos presentes nos extratos de pólen *L. perenne* e Gramíneas II, em contrapartida a irrelevante reatividade cruzada ao extrato Gramíneas I.

4. Em relação à frequência de componentes antigênicos do extrato Lm ligantes de IgE de pacientes do grupo RAS, as frações 26, 28 e 32 kDa apresentaram alta frequência de reconhecimento (> 90%) pelos anticorpos IgE presentes no soro destes pacientes, sendo que outras frações (40, 55, 66, 72 e 96-116 kDa) também podem ser consideradas importantes, uma vez que foram reconhecidas por mais de 50% dos pacientes com polinose.

5. As bandas imunodominantes de pólen de *L. multiflorum* reconhecidas por IgE de pacientes com polinose no *Immunoblotting*, sugerem serem as mesmas constituídas de componentes conservados, uma vez que apresentaram maior reatividade cruzada com alérgenos de pólen de *L. perenne* e de alérgenos do extrato Gramíneas II.

6. A fração de 55 kDa de pólen de *L. multiflorum* por apresentar alta reatividade cruzada com Lp e Gramíneas II, poderá ser de utilidade, tanto pra fins de diagnóstico como para o seu uso em imunoterapia, quando da necessidade de se utilizar uma fração mais conservada entre pólenes de gramíneas da tribo Poae.

7. A utilização de extrato e pólen de Lm deve ser preferido a aqueles que apresentam pólenes com proximidade filogenética com essa gramínea, quando da necessidade de obter determinações de sensibilização mais precisas no diagnóstico e na imunoterapia da polinose, particularmente devido a pólen de *L. multiflorum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- AALBERSE, R. C.; AKKERDAAS, J. H.; VAN REE, R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. **Allergy**, Copenhagen, v. 56, n. 6, p. 478-90, 2001.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. 5 ed. Philadelphia: Saunders, 2003, 562 p.
- ANDERSON, K.; LIDHOLM, J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 130, n. 2, p. 87-107, 2003.
- ANSARI, A. A.; KILLORAN, E. A.; MARSH, D. G. An investigation of human immune response to perennial ryegrass (*Lolium perenne*) pollen cytosome c (Lol p X). **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 80, p. 229-235, 1987.
- ANSARI, A. A.; SHENBAGAMURTHI, P.; MARSH, D. G. Complete primary structure of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p III: comparison with known Lol p I and II sequences. **Biochemistry**, Washington, v. 28, n. 21, p. 8665-8670, 1989.
- ARILLA, M. C.; IBARROLA, I.; ERASO, E.; AGUIRRE, M.; MARTÍNEZ, A.; ASTURIAS, J. A. Quantification in mass units of group 1 grass allergens by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 1271-1278, 2001.
- ARRUDA, L. K.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; BAGGIO, D.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; NASPITZ, C. K. Exposure and sensitization to house dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 433-439, 1991.
- BASS, D. J.; DELPECH, V.; BEARD, J.; BASS, P.; WALLS, R. S. Late summer and fall (March-May) pollen allergy and respiratory disease in Northern New South Wales, Australia. **Annals of Allergy and Asthma Immunology**, Arlington, v. 85, n. 5, p. 374-381, 2000.
- BEHRENDT, H.; BECKER, W. M. Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 13, n. 6, p.709-715, 2001.
- BEHRENDT, H.; BECKER, W. M.; FRITZSCHE, C.; SLIWA-TOMCZOK, W.; TOMCZOK, J.; FRIEDRICHS, K. H.; RING, J. Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 113, n. 1-3, p. 69-74, 1997.

¹SILVA, M. A.; PINHEIRO, M. S. F.; FREITAS, N. E. **Guia para normatização de trabalhos técnicos-científicos**: projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses. 2.ed. Uberlândia, EDUFU, 159p. 2002.

BERSTEIN, I. L.; PERERA, M.; GALLAGHER, J.; MICHAEL, J. G.; JOHANSSON, S. G. In vitro cross-allergenicity of major aeroallergenic pollens by the radioallergosorbent technique. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 57, n. 2, p. 141-152, 1976.

BERNSTEIN, I. L.; STORMS, W. W. Practice parameters for allergy diagnostic testing. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, Arlington, v. 75, n. 6 Pt 2, p. 543-625, 1995.

BROADWATER, A. H.; RUBINSTEIN, A. L.; CHAY, C. H.; KLAPPER, D. G.; BEDINGER, P. A. Zea mI, the maize homolog of the allergen-encoding Lol pI gene of rye grass. **Gene**, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 227-230, 1993.

CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. Medidas de biossegurança em laboratório. EDUFU: Uberlândia, 1997, 55p.

COOKSON, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **Nature**, London, v. 402, p. 18-23, 1999.

DAVIES, J. M.; BRIGHT, M. L.; ROLLAND, J. M.; O'HEHIR, R. E. Bahia grass pollen specific IgE is common in seasonal rhinitis patients but has limited cross-reactivity with Ryegrass. **Allergy**, Copenhagen, v. 60, n. 2, p. 251-255, 2005.

DREBORG, S. Skin testing: the safety of skin tests and the information obtained from using different methods and concentration of allergen. **Allergy**, Copenhagen, v. 48, n. 7, p. 473-475, 1993.

DUTRA, B. M. R. S.; ROSÁRIO FILHO, N. A.; ZAVADNIAK, A. F. Alérgenos inaláveis em Curitiba: uma revisão de sua relevância clínica. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 189-195, 2001.

EKRAMODDOULLAH, A. K. M.; KISIL, F. T.; SEHON, A. H. Immunochemical characterization of a high molecular weight basic allergen (HMBA) of rye grass (*Lolium multiflorum*) pollen. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 465-473, 1983.

ESCH, R. Evaluation of allergen vaccine potency. **Current Allergy and Asthma Reports**, Philadelphia, v. 6, n. 5, p. 402-406, 2006.

ESTEVEZ, P. C.; ROSÁRIO FILHO, N. A.; TRIPPIA, S. G.; CALEFFE, L. G. Sensibilização atópica em escolares e adultos de Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 156-160, 1999.

FAHLBUSCH, B.; HORNUNG, D.; HEINRICH, J.; DAHSE, H. M.; JAGER, L. Quantification of group 5 grass pollen allergens in house dust. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 30, n. 11, p. 1645-1652, 2000.

FAHLBUSCH, B.; MÜLLER, W. D.; RUDESCHKO, O.; JÄGER, L.; CROMWELL, O.; FIEBIG, H. Detection and quantification of group 4 allergens in grass pollen extracts using monoclonal antibodies. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 799-807, 1998.

FORD, S. A.; BALDO, B. A. A Re-Examination of ryegrass (*Lolium perenne*) pollen allergens. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 81, n. 5, p. 193-203, 1986.

FORD, S. A.; BALDO, B. A. Identification of Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) pollen allergens by electroblotting. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 79, n. 3, p. 711-720, 1987.

FREIDHOFF, L. R.; EHRLICH-KAUTZKY, E.; GRANT, J. H.; MEYERS, D. A.; MARSH, D. G. A study of the human immune response to *Lolium perenne* (rye) pollen and its components, Lol p I and Lol p II (rye I and rye II). I. Prevalence of reactivity to the allergens and correlations among skin test, IgE antibody, and IgG antibody data. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 78, n. 6, p. 1190-1201, 1986.

GELLER, M.; ESCH, R. E.; FERNANDEZ-CALDAS, E. Sensibilização acarina na atopia respiratória do Rio de Janeiro – considerações preliminares. **Anais da Academia Nacional de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 153, n. 4, p. 174-175, 1993.

GRIFFITH, I. J.; SMITH, P. M.; POLLOCK, J.; THEERAKULPISUT, P.; AVJIOGLU, A.; DAVIES, S.; HOUGH, T.; SINGH, M. B.; SIMPSON, R. J.; WARD, L. D.; KNOX, R. B. Cloning and sequencing of Lol p I, the major allergenic protein of rye-grass pollen. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 279, n. 2, p. 210-215, 1991.

GROTE, M.; VRTALA, S.; NIEDERBERGER, V.; VALENTA, R.; REICHEL, R. Expulsion of allergen-containing materials from hydrated rye grass (*Lolium perenne*) pollen revealed by using immunogold field emission scanning and transmission electron microscopy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 105, n. 6 Pt 1, p. 1140-1145, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2004. **Unidades Federativas**. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/>>. Acesso em: 15 mai. 2007.

JOHNSON, P.; MARSH, D. G. Allergens from common rye grass pollen (*Lolium perenne*). I. Chemical composition and structure. **Immunochemistry**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 91-100, 1966.

JOHANSSON, S. G. O.; O'B-HOURUHANE, J.; BOUSQUET, J.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.; DREBORG, S.; MYGIND, N.; RING, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; VAN HAGE-HAMSTEN, M.; WÜTHRICH, B. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy**, Copenhagen, v. 56, n. 9, p. 813-824, 2001.

KING, T. P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D. G.; PLATS-MILLS, T. A. E.; THOMAS, W. Allergen nomenclature. **Allergy**, Copenhagen, v. 50, n. 9, p. 765-774, 1995.

KNOX, R. B.; SUPHIOGLU, C. Environmental and molecular biology of pollen allergens. **Trends in Plant Science**, London, v. 1, n. 5, p. 156-164, 1996.

KURTZ, J. A. T. A presença de polinose na região do Planalto Médio – Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 196-202, 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAFFER, S.; VALENTA, R.; VRTALA, S.; SUSANI, M.; VAN REE, R.; KRAFT, D.; SCHEINER, O.; DUCHÊNE, M. Complementary DNA cloning of the major allergen Phl p I from timothy grass (*Phleum pratense*); recombinant Phl p I inhibits IgE binding to group I allergens from eight different grass species. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 94, n. 4, p. 689-698, 1994.

LICCARDI, G.; KORDASH, T. R.; RUSSO, M.; NOSCHESE, P.; CALIFANO, C.; D'AMATO, M.; D'AMATO, G. Why are nasal and bronchial symptoms mostly perennial in patients with monosensitization to *Olea europaea* pollen allergens? **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Barcelona, v. 6, n. 6, p. 371-377, 1996.

LIPIEC, A.; RAPIEJKO, P.; SAMOLINSKI, B.; KZYCH, E. Correlation between conjunctival provocation test results and conjunctival symptoms in pollinosis - preliminary report. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Lublin, v. 12, n. 1, p. 17-20, 2005.

LOVBORG, U.; BAKER, P. J.; TAYLOR, D. J. M.; YIN, P.; TOVEY, E. R. Subtribe-specific monoclonal antibodies to *Lolium perenne*. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 29, n. 7, p. 973-981, 1999.

LOWRY, H.; ROSENBOROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.193, p. 265-275, n. 1, 1951.

MARTH, K.; FOCKE, M.; FLICKER, S.; VALENTA, R. Human monoclonal antibody-based quantification of group 2 grass pollen allergens. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 113, n. 3, p. 470-474, 2004.

MARTIN, B. G.; MANSFIELD, L. E.; NELSON, H. S. Cross-allergenicity among the grasses. **Annals of Allergy**, McLean, v. 54, n. 2, p. 99-104, 1985.

MATTHIESEN, F.; SCHUMACHER, M. J.; LOWENSTEIN, H. Characterization of the major allergen of *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) pollen, Cyn d I. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 88, n. 5, p. 763-774, 1991.

MISTRELLO, G.; RONCAROLO, D.; ZANONI, D.; ZANOTTA, S.; AMATO, S.; FALAGIANI, P.; ARIANO, R. Allergenic relevance of *Cupressus arizonica* pollen extracts of the allergoid. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 129, n. 4, p. 296-304, 2002.

MOHAPATRA, S. S.; LOCKEY, R. F.; SHIRLEY, S. Immunobiology of grass pollen allergens. **Current Allergy and Asthma Reports**, Philadelphia, v. 5, n. 5, p. 381-387, 2005.

MOREIRA, P. F. S. **Reatividade anticórpica IgE, IgG1 e IgG4 específica a antígenos de pólen de *Lolium multiflorum* (Lam. 1779) em pacientes com polinose.** 68 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

MOTTA, A.; PELTRE, G.; DORMANS, J. A. M. A.; WITHAGEN, C. E. T.; LACROIX, G.; BOIS, F.; STEERENBER, P. A. *Phleum pratense* pollen starch granules induce humoral and cell-mediated immune responses in a rat model of allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 310-314, 2004.

NIEDERBERGER, V.; LAFFER, S.; FRÖSCHL, R.; KRAFT, D.; RUMPOLD, H.; KAPIOTIS, S.; VALENTA, R.; SPITZAUER, S. IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 101, n. 2 Pt 1, p. 258-264, 1998.

NIEMEIJER, N. R.; KAUFFMAN, H. F.; VAN HOVE, W.; DUBOIS, A. E. J. Effect of dilution, temperature, and preservatives on the long-term stability of standardized inhalant allergen extracts. **Annals of Allergy and Asthma Immunology**, Arlington, v. 76, n. 6, p. 535-540, 1996.

ONG, E. K.; GRIFFITH, I. J.; KNOX, R. B.; SINGH, M. B. Cloning of a cDNA encoding a group-V (group-IX) allergen isoform from rye-grass pollen that demonstrates specific antigenic immunoreactivity. **Gene**, Amsterdam, v. 134, n. 2, p. 235-240, 1993.

PIPKORN, U.; HAMMARLUND, A.; ENERBACK, L. Prolonged treatment with topical corticosteroids results in an inhibition of the allergen-induced wheal-and-flare response and a reduction in skin mast cell numbers and histamine content. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 19-25, 1989.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; THOMAS, W. R.; AALBERSE, R. C.; VERVLOET, D.; CHAPMAN, M. D. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 89, n. 5, p. 1046-1060, 1992.

PREFEITURA MUNICIPAL DE CAXIAS DO SUL, 2007. **A cidade**. Disponível em: <http://www.caxias.rs.gov.br/dados_gerais/caracteristicas_fisicas>. Acesso em: 14 mai. 2007.

REINBERG, A.; GERVAIS, P.; LEVI, F.; SMOLENSKY, M.; DEL CERRO, L.; UGOLINI, C. Circadian and circannual rhythms of allergic rhinitis: an epidemiologic study involving chronobiologic methods. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 81, n. 1, p. 51-62, 1988.

RIED, C. A.; ROSARIO, N. A.; RIBAS, L. F. O.; BACKES, A. S.; KLEINIIBING, G. F.; POPIJA, M.; REISDÖRFER, S. Increase in prevalence of rhinoconjunctivitis but not asthma and atopic eczema in teenagers. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Barcelona, v. 15, n. 3, p. 183-188, 2005.

RING, J.; KRÄMER, U.; SCHÄFER, T.; BEHRENDT, H. Why are allergies increasing? **Current Opinion in Immunology**, London, v. 13, n. 6, p. 701-708, 2001.

RIZZO, M. C.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; BAGGIO, D.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; NASPITZ, C. K. IgG and IgE antibody responses to dust mite allergens among children with asthma in Brazil. **Annals of Allergy**, Mc Lean, v. 71, n. 2, p. 152-158, 1993.

ROSÁRIO FILHO, N. A. Contagem de polens aéreos na cidade de Curitiba. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 6, n. 1-4, p. 12-15, 1983.

ROSÁRIO FILHO, N. A. Sensibilidade ao pólen de *Ligustrum lucidum* em pacientes com alergia respiratória. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 7, p. 8-9, 1984.

ROSÁRIO FILHO, N. A. Análise de 50 casos de polinose por gramíneas. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 25-29, 1987.

ROSÁRIO FILHO, N. A. Reflexões sobre Polinose: 20 anos de experiência. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 20, p. 210-213, 1997.

ROSARIO-FILHO, N. A.; VILLELA, M. M. S. Quantitative skin prick test and serum IgE antibodies in atopic asthmatics. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Barcelona, v. 7, n. 1, p. 40-45, 1997.

ROSÁRIO FILHO, N. A. Sensibilização atópica a aeroalérgenos em crianças asmáticas em Curitiba. **Jornal Paranaense de Pediatria**, Curitiba, v. 3, n. 4, p. 80-82, 2002.

SARINHO, E.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; JUST, E.; SOLÉ, D. Ácaros da poeira domiciliar em residências de crianças asmáticas e controles da cidade do Recife – Pernambuco. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 19, p. 228-230, 1996.

SCHÄPPI, G. F.; TAYLOR, P. E.; PAIN, M. C. F.; CAMERON, P. A.; DENT, A. W.; STAFF, I. A.; SUPHIOGLU, C. Concentrations of major grass group 5 allergens in pollen grains and atmospheric particles: implications for hay fever and allergic asthma sufferers sensitized to grass pollen allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 633-641, 1999.

SCHUMACHER, M. J.; GRABOWSKI, J.; WAGNER, C. M. Anti-Bermuda grass RAST binding is minimally inhibited by pollen extracts from the other grasses. **Annals of Allergy**, Mc Lean, v. 55, n. 4, p. 584-587, 1985.

SHCHERBAN, T. Y.; SHI, J.; DURACHKO, D. M.; GUILTINAN, M. J.; MCQUEEN-MASON, S. J.; SHIEH, M.; COSGROVE, D. J. Molecular cloning and sequence analysis of expansins – a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 20, p. 9245–9249, 1995.

SINGH, M. B.; HOUGH, T.; THEERAKULPISUT, P.; AVJIOGLU, A.; DAVIES, S.; SMITH, P. M.; TAYLOR, P.; SIMPSON, R. J.; WARD, L. D.; MCCLUSKEY, J.; PUY, R.; KNOX, R. B. Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: intracellular targeting to the amyloplast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 4, p. 1384-1388, 1991.

SINGH, M. B.; KNOX, R. B. Grass pollen allergens: antigenic relationships detected using monoclonal antibodies and dot blotting immunoassay. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, Basel, v. 78, n. 3, p. 300-304, 1985.

SLOTT, R. I.; ZWEIMAN, B. A Controlled study of the effect of corticosteroids on immediate skin test reactivity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 54, n. 4, p. 229-235, 1974.

SMART, I. J.; TUDDENHAM, W. G.; KNOX, R. B. Aerobiology of grass pollen in the city atmosphere of Melbourne: effects of weather parameters and pollen sources. **Australian Journal of Botany**, East Melbourne, v. 27, p. 333-342, 1979.

SMITH, P. M.; ONG, E. K.; KNOX, R. B.; SINGH, M. B. Immunological relationships among group I and group V allergens from grass pollen. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 491-498, 1994.

SOLOMON, W. R. Aerobiology of pollinosis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 74, p. 449-461, 1984.

SOPELETE, M. C.; MOREIRA, P. F. S.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; VIEIRA, F. A. M.; SUNG, S. S.; TAKETOMI, E. A. Sensitization to *Lolium multiflorum* Grass Pollen in Pollinosis Patients: Evaluation of allergenic fractions recognized by specific IgE antibodies. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 140, n. 2, p. 121-130, 2006.

STAFF, I. A.; TAYLOR, P. E.; SMITH, P.; SINGH, M. B.; KNOX, R. B. Cellular localization of water soluble, allergenic proteins in rye-grass (*Lolium perenne*) pollen using monoclonal and specific IgE antibodies with immunogold probes. **The Histochemical Journal**, London, v. 22, n. 5, p. 276-290, 1990.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H.F. **Pollen. Biology – Biochemistry – Management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974.

SUCK, R.; HAGEN, S.; CROMWELL, O.; FIEBIG, H. The high molecular mass allergen fraction of timothy grass pollen (*Phleum pratense*) between 50-60 kDa is comprised of two major allergens: Phl p 4 and Phl p 13. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 30, n. 10, p. 1395-1402, 2000.

SUPHIOGLU, C. Thunderstorm asthma due to grass pollen. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 116, n. 4, p. 253-260, 1998.

SUPHIOGLU, C. What are the important allergens in grass pollen that are linked to human allergic disease? **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 30, n. 10, p. 1335-1341, 2000.

SUPHIOGLU, C.; MAWDSLEY, D.; SCHÄPPI, G.; GRUEHN, S.; DE LEON, M.; ROLLAND, J. M.; O'HEHIR, R. E. Molecular cloning, expression and immunological characterization of Lol p 5C, a novel allergen isoform of rye grass pollen demonstrating high IgE reactivity. **FEBS Letters**, Amsterdam v. 462, n. 5, p. 435-441, 1999.

SWOBODA, I.; DE WEERD, N.; BAHALLA, P. L.; NIEDERBERGER, V.; SPERR, W. R.; VALENT, P.; KAHLERT, H.; FIEBIG, H.; VERDINO, P.; KELLER, W.; EBNER, C.; SPITZAUER, S. Mutants of the major ryegrass pollen allergen, Lol p 5, with reduced IgE binding capacity: candidates for grass pollen-specific immunotherapy. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 32, n. 1, p. 270-280, 2002.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TUNNICLIFFE, W. S.; FLETCHER, T. J.; HAMMOND, K.; ROBERTS, K.; CUSTOVIC, A.; SIMPSON, A.; WOODCOCK, A.; AYRES, J. G. Sensitivity and exposure to indoor allergens in adults with differing asthma severity. **The European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 13, n. 3, p. 654-659, 1999.

VALENTA, R.; NIEDERBERGER, V. Recombinant allergens for immunotherapy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 119, n. 4, p. 826-830, 2007.

VAN REE, R.; VAN LEEUWEN, W. A.; VAN DEN BERG, M.; WELLER, H. H.; AALBERSE, R. C. IgE and IgG cross-reactivity among Lol p I and Lol p II/III: identification of the C-termini of Lol p I, II, and III as cross-reactive structures. **Allergy**, Copenhagen, v. 49, n. 4, p. 254-261, 1994.

VIEIRA, F. A. M. Polinose no Brasil. In: NEGREIROS, E. B.; UNGIER, C. **Alergologia Clínica**. São Paulo: Atheneu, 1995. cap. 3, p. 106-111.

VIEIRA, F. A. M. Existe polinose no Brasil tropical? **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 71-72, 2002.

VIEIRA, F. A. M. Novas práticas agropastoris estão influenciando a relação meio ambiente/polinose no sul do Brasil? **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 37-38, 2003.

VIEIRA, F. A. M.; FERREIRA, E. M.; MATTER, L. B. A prevalência de polinose está associada com a cultura do *Lolium multiflorum*. **Revista Brasileira de Alergia e Immunopatologia**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 47-52, 2005.

VIEIRA, F. A. M.; NEGREIROS, E. B. Epidemiologia da polinose na população de algumas cidades do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Alergia e Immunopatologia**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 73-78, 1989.

VRTALA, S.; GROTE, M.; DUCHENE, M.; VAN REE, R.; KRAFT, D.; SCHEINER, O.; VALENTA, R. Properties of tree and grass pollen allergens: reinvestigation of the linkage between solubility and allergenicity. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 102, n. 2, p. 160-169, 1993.

WEBER, R. W. Patterns of pollen cross-allergenicity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 112, n. 2, p. 229-239, 2003.

WÜTHRICH, B.; SCHINDLER, C.; LEUENBERGER, P.; ACKERMANN-LIEBRICH, P. Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA study). **International Archives of Allergy and Clinical Immunology**, Basel, v. 106, n. 2, p. 149-156, 1995.

ANEXOS

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - ☎ (034) 235-2078 FONE/FAX (034) 239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 129/03

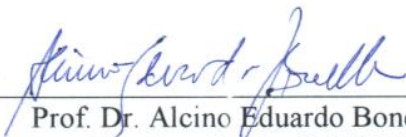
Uberlândia, 22 de setembro de 2003.

Ilmo(a) Sr.(a).
Prof.(a).Dr.(a). Ernesto Akio Taketomi

Prezado(a). Professor(a),

Informamos-lhe, que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia, examinou e **APROVOU** o projeto de pesquisa "**Sensibilização alérgica em pacientes atópicos e caracterização morfofuncional dos alérgenos derivados de pólen de gramínea (*Lolium multiflorum*, Lam, 1779)**", protocolado sob o número **089/2003**, do qual V.Sa. figura como pesquisador responsável, para ser desenvolvido a partir desta data.

Em adendo, informamos que o prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.



Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coordenador do CEP/UFU

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado “**Detecção e caracterização da resposta de anticorpos IgE a alérgenos de pólen de azevém (*Lolium multiflorum*, Lam. 1779) por ELISA e *Immunoblotting*”**. O referido projeto tem como objetivo principal determinar qual a parte do grão de pólen do azevém causa alergia e como os pacientes alérgicos respondem quanto à produção de anticorpos específicos.

Estou ciente de todos os procedimentos abaixo relacionados aos quais serei submetido (a) e que serão realizados na Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica, Campus Umuarama, Bloco 4C em Uberlândia-Minas Gerais, e/ou no consultório do Prof. Dr. Francisco A. M. Vieira na cidade de Caxias do Sul-Rio Grande do Sul, a saber:

- Necessidade de coleta de sangue.
- Realização de exames complementares tais como teste cutâneo com alérgenos inaláveis.

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta, ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a investigação. Terei a liberdade de me retirar da pesquisa a qualquer momento em que desejar sem necessidade prévia de explicações.

Será respeitado o caráter confidencial das informações fornecidas, não sendo permitida a minha identificação.

_____, ____ de _____ de 200_.

ASSINATURA

TESTEMUNHA

APÊNDICE 1

Tabela com as médias de frequências de inibição de cada fração protéica de *Lolium multiflorum*, para cada inibidor utilizado

Frações protéicas (kDa)	Porcentagem de Inibição (Média ± Desvio padrão)			
	Lm	Lp	GI	GII
14	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
19-21	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
23	100 ± 0	76,6 ± 40,6	73,8 ± 45,3	77,8 ± 38,4
24	94,0 ± 14,7	76,8 ± 29,7	77,9 ± 35,3	80,1 ± 32,5
26	84,1 ± 20,9	43,6 ± 22,2	25,8 ± 11,3	56,6 ± 24,8
28	82,4 ± 18,0	57,1 ± 34,5	42,6 ± 35,5	60,2 ± 31,6
32	94,8 ± 11,1	61,1 ± 27,9	46,2 ± 40,1	70,9 ± 25,7
40	100 ± 0	59,3 ± 32,4	47,2 ± 42,5	60,9 ± 32,3
55	100 ± 0	79,0 ± 32,9	48,0 ± 39,0	81,3 ± 29,2
66	100 ± 0	64,9 ± 31,0	43,6 ± 38,	66,4 ± 26,6
72	95,0 ± 13,2	66,14 ± 32,2	48,0 ± 40,4	73,4 ± 30,6
78	93,6 ± 16,9	58,9 ± 39,4	42,9 ± 42,3	74,1 ± 29,4
84	95,4 ± 13,9	47,5 ± 32,2	32,2 ± 30,9	72,2 ± 31,3
96-116	86,9 ± 17,7	30,8 ± 11,7	22,5 ± 14,9	48,0 ± 26,0