



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

**PERFIL DE PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS DERIVADAS DO EXTRATO
TOTAL DE POLENS DE *Lolium multiflorum* E DE SUA FRAÇÃO
RECONHECIDAS POR ANTICORPOS DAS CLASSES IgE E IgG4 DE
PACIENTES ATÓPICOS COM POTENCIAL DIAGNÓSTICO E
TERAPÊUTICO**

ALESSANDRO SOUSA CORREA

Uberlândia

Julho-2019



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

**PERFIL DE PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS DERIVADAS DO EXTRATO
TOTAL DE POLENS DE *Lolium multiflorum* E DE SUA FRAÇÃO
RECONHECIDAS POR ANTICORPOS DAS CLASSES IgE E IgG4 DE
PACIENTES ATÓPICOS COM POTENCIAL DIAGNÓSTICO E
TERAPÊUTICO**

Dissertação apresentada ao
Colegiado do Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como
requisito parcial a obtenção do
título de Mestre.

ALESSANDRO SOUSA CORREA

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Co-orientadora: Dra. Juliana Silva Miranda

Uberlândia

Julho-2019



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Alessandro Sousa Correa

“Perfil de proteínas antigênicas derivados do extrato total de *Lolium multiflorum* e de sua fração reconhecidas por anticorpos das classes IgE e IgG4 de pacientes atópicos com potencial diagnóstico e terapêutico”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 19 de julho de 2019.

Prof. Dra. Priscila Ferreira de Sousa Moreira – IFTM

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho – INGEB/UFU

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi (orientador) – ICBIM/UFU

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C824 2019	<p>Correa, Alessandro Sousa, 1993- PERFIL DE PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS DERIVADAS DO EXTRATO TOTAL DE POLENS DE <i>Lolium multiflorum</i> E DE SUA FRAÇÃO RECONHECIDAS POR ANTICORPOS DAS CLASSES IgE E IgG4 DE PACIENTES ATÓPICOS COM POTENCIAL DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICO [recurso eletrônico] / Alessandro Sousa Correa. - 2019.</p> <p>Orientador: Ernesto Akio Taketomi. Coorientadora: Juliana Silva Miranda. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2225 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Akio Taketomi, Ernesto , 1963-, (Orient.). II. Silva Miranda, Juliana, 1983-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe **Edneia Regina de Sousa** e a minha tia **Eliane Cristina de Sousa**, segunda mãe, por todo o seu auxílio e cuidado ao longo de minha vida, sem vocês não sei o que seria de mim.

Dedico também ao meu pai **Roberto Marcio Correa**, pelo auxílio e palavras de incentivo para que eu pudesse continuar.

Às minhas irmãs, **Roberta Sousa Barbosa** e **Giovanna Sousa Barbosa**, que são partes essenciais em minha vida.

Para sempre em meu coração.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à **Deus**, que em mim derramou o milagre da vida, me fortaleceu em todos os momentos e através das dificuldades me ensinou a não desistir.

Agradeço à minha família, em especial minha mãe **Ednéia** e minha tia **Eliane**, minha segunda mãe, ambas em momento algum me desampararam. Também agradeço meu pai, **Roberto**, e minhas irmãs, **Roberta** e **Giovanna**, que tanto amo.

Agradeço a todos da minha família, aos quais ajudaram a moldar meu caráter.

Agradeço a todos os professores que tive em minha vida, desde o pré-escolar até o mestrado, todos foram fundamentais em minha formação e são partes indissolúveis desta conquista.

Deixo minha gratidão a minha melhor amiga, e quase irmã, **Alessandra**, e minha amiga, **Beatriz**. Também agradeço aos meus colegas de pesquisa, que me proporcionaram tantos momentos incríveis, **Laura, Karine, Vinícius e Hellen**, os quais fizeram parte dessa longa e proveitosa jornada sem vocês a vida acadêmica não seria a mesma.

Quero agradecer a todos os integrantes do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, que me auxiliaram nos momentos necessários, sempre se colocando à disposição para me auxiliarem, em especial à técnica Dra. **Ana Cláudia Pajuaba** e ao Prof. Dr. **José Roberto Mineo**.

Agradeço imensamente ao professor Dr. **Francisco de Assis Machado Vieira**, de Caxias do Sul-RS, pelo atendimento clínico dos pacientes, a coleta de sangue e envio de materiais

para pesquisa neste trabalho realizada, incluindo polens de *Lolium multiflorum*.

Agradeço ao Prof. Dr. **Jair Pereira da Cunha Júnior**, por todas as dicas e instruções, à minha co-orientadora Dra. **Juliana Silva Miranda**, que em todo o tempo me instruiu, e posso dizer que por sua ajuda, serei um profissional melhor e ao Prof. Dr. **Ernesto Akio Taketomi**, que me recebeu de braços abertos no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, sem o senhor essa realização não seria possível.

As agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo incentivo e apoio financeiro, o meu muito obrigado.

Por isso não desfalecemos; mas, ainda que o nosso homem exterior se corrompa, o interior, contudo, se renova de dia em dia.

Porque a nossa leve e momentânea tribulação produz para nós um peso eterno de glória mui excelente;

Não atentando nós nas coisas que se vêem, mas nas que se não vêem; porque as que se vêem são temporais, e as que se não vêem são eternas.

2° Coríntios 4:16-18

Lista de Abreviaturas

ABTS	2,2'-diazino do ácido etil-benzotiazolina sulfônico
APCs	células apresentadoras de antígeno profissionais
AT	atópicos
β-expansina	beta expansina
BSA	soroalbumina bovina
CM	carboximetil
DAB	3'3-tetrahydrocloroeto de diaminobenzidina
D.O.	densidade óptica
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
<i>GATA 3</i>	<i>GATA binding protein 3</i>
H ₂ O ⁰	água <i>milli Q</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IgA	imunoglobulina A
IgE	imunoglobulina E
IgG	imunoglobulina G
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
IL-9	interleucina 9
IL-10	interleucina 10
IL-13	interleucina 13
IL-25	interleucina 25
IL-33	interleucina 33
ILCs	células linfoides inatas
IFN-γ	interferon gama
ITE	imunoterapia específica com alérgenos
kDa	kilodáltons
Lm	<i>Lolium multiflorum</i>
<i>L. multiflorum</i>	<i>Lolium multiflorum</i>
MHC-II	complexo de histocompatibilidade principal de classe II
NAT	não-atópicos
PARs	receptores ativados por proteases

PBS	salina tamponada com fosfatos
PBS-T	salina tamponada com fosfatos acrescido de Tween a 0,05%
PRRs	receptores de reconhecimento padrão
ROS	espécies reativas de oxigênio
S1	sobrenadante 1
S2	sobrenadante 2
SDS-PAGE	dodecil sulfato de sódio-eletroforese Vertical em Gel de Poliacrilamida
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Th	células T helper
TCP	teste cutâneo de puntura
TCR	receptor de célula T
TLRs	receptores semelhantes ao Toll
Treg	células T regulatórias
TSLP	linfopietina estromal tímica

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos principais alérgenos presentes em gramíneas.

Tabela 2. Características demográficas e clínicas dos pacientes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resposta imune inata e adaptativa no desenvolvimento das doenças alérgicas.

Figura 2. Cromatografia de troca iônica em coluna CM (carboximetil) Sepharose. Pico 1, estão representadas as proteínas não ligadas (VOID) a coluna; Pico 2 estão representadas as amostras da fração eluídas a 200 mM de NaCl que foram utilizadas. Em 3 estão representadas as amostras da fração eluídas a 200 mM de NaCl que não foram utilizadas. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 280 nm. Os valores de absorvância estão expressos em Densidade Óptica (D.O.).

Figura 3. Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 14%, corados por *Coomassie blue*. (1) Linha 1, padrão de peso molecular em kiloDaltons (kDa); (2) Linha 2, extrato total do pólen de *Lolium multiflorum* (S1), (3) Linha 3, fração de *L. multiflorum* eluída a 200 mM de NaCl por cromatografia de troca iônica (S2).

Figura 4. Níveis séricos de anticorpos IgE específicos ao extrato total do pólen de *Lolium multiflorum* (Lm) (S1) e à fração de Lm (S2), determinados por ELISA, em indivíduos atópicos (AT) e não-atópicos (NAT) estão representados em (A) e (B), respectivamente. Em (C) é demonstrada a correlação entre os níveis de anticorpos IgE específicos ao extrato total (S1) e à fração (S2). Os valores estão expressos por Densidade Óptica (D.O.). As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste *Mann-Whitney*. A correlação foi analisada pelo teste de *Spearman*. As barras horizontais indicam a mediana e a linha tracejada indica o valor do *cut-off* (0,2). Os valores de “p” foram considerados significativos quando $< 0,05$ (**** $p < 0,0001$).

Figura 5. Níveis séricos de anticorpos da subclasse IgG4 específicos ao extrato total do pólen de *L. multiflorum* (S1) e à sua fração (S2), avaliados por ELISA, em indivíduos atópicos (AT) e não-atópicos (NAT) estão demonstrados em (A) e (B), respectivamente. Em (C) está mostrada a correlação entre os níveis de anticorpos IgG4 específicos ao extrato total S1 e à fração S2. Os valores estão expressos em densidade óptica (D.O.). As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste *Mann-Whitney*. A correlação foi analisada pelo coeficiente de *Spearman*. As barras horizontais indicam a mediana e a linha tracejada indicam o valor do *cut-off* (0,2). Os valores de “p” foram considerados significativos quando $< 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Figura 6. Reatividade de anticorpos séricos IgE por *immunoblotting* frente aos componentes do extrato S1 (Figura 6A) e da fração S2 (Figura 6B). Na coluna 1, padrão de peso molecular (PM) em kDa. As colunas 2-4 representam a reatividade de IgE frente aos *pools* de soros de pacientes do grupo AT; a coluna 5 representa a reatividade de IgE frente ao *pool* de soros de indivíduos do grupo NAT.

Figura 7. Frequência (%) de reatividade de cada um dos componentes do extrato total de *Lolium multiflorum* (S1) e da fração S2 reconhecidos pelos anticorpos da classe IgE nos soros de pacientes atópicos ($n = 35$, testados em 7 *pools* constituídos por 5 soros cada) analisados por *immunoblotting*. A linha tracejada indica $> 50\%$ de reconhecimento.

Figura 8. Reatividade de anticorpos séricos IgG4 por *immunoblotting* frente aos componentes do extrato S1 e à fração S2. Em 2 e 4, *immunoblotting*-IgG4 utilizando o extrato S1 e a fração S2, respectivamente, frente a um *pool* de soros do grupo AT. Em 3 e 5, um *pool* de soros negativos frente ao extrato total S1 e à fração S2, respectivamente. O peso molecular (PM) relativo em kDa está demonstrado na vertical à esquerda na coluna 1.

Sumário

1. Introdução	19
1.1 Doenças Alérgicas	19
Rinite alérgica sazonal	21
1.2 Mecanismos de resposta imune inata e adaptativa no desenvolvimento de doenças alérgicas respiratórias	21
1.3 Diagnóstico da alergia	23
1.4 Imunoterapia específica com alérgenos	24
1.5 Polens	25
1.6 <i>Lolium multiflorum</i> (Lm)	27
1.7 Identificação de isoformas antigênicas para aplicações laboratoriais	28
1.8 Purificação de proteínas para aplicação na detecção da alergia	29
2. Hipóteses	31
3. Objetivos	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. Materiais e Métodos	33
4.1 Seleção de pacientes com rinite alérgica sazonal e indivíduos controles	33
4.3 Cromatografia de Troca Iônica	34
4.4 Teste Cutâneo de Puntura	34
4.5 Coleta de sangue	35
4.6 ELISA para detecção de IgE sérica específica a <i>L. multiflorum</i>	35
4.7 ELISA para detecção de IgG4 específica a alérgenos do pólen <i>L. multiflorum</i>	35
4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional (SDS-PAGE)	36
4.9 Eletrotransferência para membranas de nitrocelulose	36
4.10 <i>Immunoblotting</i> para detecção de anticorpos IgE e IgG4 específicos	36
4.11 Análise estatística	37
5. Resultados	38
5.1. Caracterização demográfica e clínica dos pacientes	38
5.2. Dosagem proteica	39
5.3. Cromatografia de troca iônica	39
5.4. Perfil eletroforético do extrato S1 e da fração S2 separados por eletroforese	40
5.5. Níveis de anticorpos da classe IgE específicos ao extrato S1 e fração S2	41
5.6. Níveis de anticorpos da subclasse IgG4 específicos ao extrato S1 e à fração S2	44
5.7. Perfil de reatividade de anticorpos IgE aos componentes alérgênicos do extrato S1 e da fração S2 separados por eletroforese	46
6. Discussão.....	49

7. Conclusões	57
Referências Bibliográficas	58
Anexos.....	69
Anexo 1	69
Anexo 2	72
Anexo 3	74

Resumo

Lolium multiflorum (Lm) é uma espécie de gramínea que tem sido caracterizada como uma importante fonte alergênica na sensibilização de indivíduos na região sul do Brasil. Apesar de sua relevância, não há muitas informações importantes na literatura que caracterizem seus alérgenos, bem como a resposta imune dos pacientes frente a essa fonte alergênica, o que dificulta o diagnóstico e tratamento específico dos pacientes. O objetivo nesse estudo foi avaliar os antígenos imunodominantes do extrato total de Lm (S1) e da fração isolada (S2) com potencial aplicação para o diagnóstico da alergia, por meio da frequência da reatividade dos anticorpos IgE e IgG4. Para tanto, foi feita a extração de proteínas do pólen de Lm com PBS, centrifugada e dialisada e denominada sobrenadante 1 (S1), e então foi utilizado um protocolo de cromatografia de troca iônica para isolar β -expansinas de S1, fração essa nomeada de sobrenadante 2 (S2). Após isso, tanto S1 quanto S2 foram submetidas a SDS-PAGE para obter o perfil eletroforético. Para a avaliação da reatividade de anticorpos específicos, 46 pacientes atópicos (AT) e 16 não-atópicos (NAT) foram selecionados por meio do teste cutâneo de puntura. Os níveis de anticorpos IgE e IgG4 específicos a S1 e S2 foram determinados por ELISA e *Immunoblotting*. O perfil eletroforético de S1 revelou maior intensidade nas bandas de 12, 32 e 58 kDa, enquanto a de 32 kDa foi o principal componente na fração S2. Os níveis de anticorpos específicos da classe IgE mensurados por ELISA frente a S1 foram significativamente maiores em AT quando comparados a indivíduos NAT, da mesma maneira, os níveis de anticorpos específicos da classe IgE mensurados por ELISA frente a S2 foram significativamente maiores em pacientes AT quando comparados a NAT, mostrando um grau semelhante de reatividade de IgE ao extrato S1 e fração S2. Os níveis de anticorpos da subclasse IgG4 também foram significativamente maiores, em soros de indivíduos AT quando comparados a soros de indivíduos NAT frente ao extrato S1, da mesma forma os níveis de anticorpos da subclasse IgG4 foram significativamente maiores em soros de indivíduos AT quando comparados aos soros de indivíduos NAT frente a fração S2, o que revela similitude nas reatividades ao extrato S1 e a fração S2. A reatividade dos anticorpos das classes IgE e IgG4 dos soros de pacientes AT frente a S1 e S2 demonstrou que a banda de 32 kDa foi o componente com maior reatividade em ambos os extratos, reconhecidos por 100% dos *pools* de soros. Assim, este estudo demonstrou que a fração S2 é tão efetiva quanto o extrato alergênico S1 para o diagnóstico de indivíduos atópicos, com destaque para a banda de 32 kDa que foi o componente mais imunodominante,

podendo assim ser o principal alérgeno no desencadeamento da resposta alérgica induzida por Lm. Além disso, os resultados de IgG4 também são promissores e novos estudos são necessários para entender melhor se S2 pode ser útil na imunoterapia específica.

Palavras chave: alergia, *Lolium multiflorum*, cromatografia de troca iônica, ELISA, immunoblotting, IgE, IgG4

Abstract

Lolium multiflorum (*Lm*) has been an important source for sensitizing individuals in the southern region of Brazil but despite its importance, there is no information in the literature that characterizes its allergens, making it difficult for specific diagnosis and treatment of patients. The aim was to characterize novel immunodominant antigens derived from *Lm* total extract (S1) and a fraction isolated (S2) in this study with potential application for allergy diagnosis by evaluating the frequency of IgE and IgG4 reactivity. An ion-exchange chromatography protocol was used to isolate β -expansins from the S1 and the eluted aliquot was named S2. After that, both extracts were submitted to SDS-PAGE to obtain the electrophoretic profile. For evaluating the reactivity of specific antibodies, 46 atopic (AT) patients and 16 non-atopic (NAT) individuals were selected. The levels of specific IgE and IgG4 antibodies against S1 or S2 were determined by ELISA and Immunoblotting. The electrophoretic profile of S1 total extract showed more intensity with 12, 32, and 58 kDa bands while the 32 kDa was the main component in the S2 fraction. Specific IgE antibody levels measured by ELISA were significantly greater in AT compared to NAT subjects, using either S1 extract or S2 fraction, showing a similar degree of IgE reactivity in all individuals when using S1 or S2 in the coating phase. Specific IgG4 antibody levels measured by ELISA were significantly greater in AT compared to NAT subjects, using either S1 extract or S2 fraction, showing a similar degree of IgG4 reactivity in all individuals when using S1 or S2 in the coating phase. Thus, this study demonstrated that S2 is as effective as S1 allergen extract for diagnosing atopic individuals, particularly, the 32 kDa band was the most immunodominant component and it may be a major allergen in triggering the allergic response induced by *Lm*. The frequency of serum reactivity from AT patients against S1 and S2 extracts determined that the 32 kDa band was the component with the highest reactivity in both extracts, recognized by 100% of the serum pools of AT patients. Thus, this study demonstrated that the S2 fraction is as effective as the S1 allergenic extract for the diagnosis of atopic individuals, especially the 32 kDa band that was the most immunodominant component and could therefore be the main allergen in triggering the allergic response induced by *Lm*. In addition, IgG4 results are also promising and further studies are needed to be performed to better understand whether S2 may be useful in specific immunotherapy.

Keywords: allergy, *Lolium multiflorum*, ion exchange chromatography, ELISA, immunoblotting, IgE, IgG4

1. Introdução

1.1 Doenças Alérgicas

Na década de 1920, o termo atopia foi utilizado para designar a predisposição genética que alguns indivíduos têm para produzir imunoglobulina E (IgE) específica em resposta a baixas doses de alérgenos, geralmente proteínas inócuas. Assim, indivíduos atópicos respondem com altos níveis de IgE frente a diferentes alérgenos (BALDACARA et al., 2013; JOHANSSON et al., 2004).

Por outro lado, o termo alergia amplamente utilizado como sinônimo de hipersensibilidade do tipo I (hipersensibilidade imediata), é empregado para se referir à reação desencadeada pela resposta a um antígeno não-próprio, por meio de anticorpos, particularmente IgE, citocinas, dentre outros. Esta resposta pode causar manifestações clínicas, com efeitos prejudiciais ao organismo (BALDACARA et al., 2013).

As doenças alérgicas como a rinite, asma, dermatite atópica, dentre outras são provenientes de uma resposta exacerbada do sistema imunológico frente a antígenos normalmente inócuos (estímulos exógenos). Esses alérgenos podem ser derivados de diferentes fontes como polens, ácaros e epitélio de animais domésticos (cães e gatos), mas podem também ser advindos de alimentos como leite de vaca, ovos, trigo, soja, amendoim, nozes, frutas, frutos do mar, etc. Ainda, podem haver outros desencadeadores como peçonha de himenópteros e fármacos (MONCHY et al., 2013; POMIECINSKI et al., 2017).

Dentre as diferentes doenças alérgicas, tem sido relatado que as doenças alérgicas respiratórias como a asma e a rinite têm se tornado um dos principais problemas de saúde na sociedade moderna, sendo que estudos apontam que são mais prevalentes em crianças e adultos de países desenvolvidos quando comparadas a países subdesenvolvidos, porém nos primeiros parece ter alcançado um platô, diferentemente dos países subdesenvolvidos (HATZLER; HOFMAIER; PAPADOPOULOS, 2012).

Neste sentido, estudos têm demonstrado maior prevalência de doenças alérgicas em crianças e adolescentes de áreas urbanas em comparação às de zona rural (SHPAKOU et al., 2012). A hipótese da higiene tem confirmado a importância do estímulo do sistema imune (HATZLER; HOFMAIER; PAPADOPOULOS, 2012), já que atualmente cada vez mais as crianças durante a primeira infância têm sido menos expostas a agentes microbianos, incitando assim o sistema imune a respostas mais exacerbadas e/ou desviadas frente a antígenos. Outro estudo também relatou que há maior prevalência de rinite alérgica em crianças e adolescentes

com um ou dois pais alérgicos, quando comparados a indivíduos de mesma idade que não possui progenitores com histórico de alergia (KEIL et al., 2010).

Em recente estudo com pacientes jovens (18 a 26 anos) foi identificado diversos fatores de risco associados à presença de doenças alérgicas. Foi observado que algumas doenças atingem principalmente homens, como é o caso da asma, e principalmente os que apresentam histórico de tabagismo, exposição a cães e gatos no ambiente domiciliar, bem como a presença de alergia na história familiar. Porém, outras patologias como eczema e erupções da pele foram relatadas com mais frequência em mulheres. Também foi observado que aqueles que possuem cães e gatos em casa, têm maior probabilidade de desenvolver duas ou mais doenças alérgicas (ZIYAB, 2017).

Em algumas grandes cidades brasileiras tem sido observado diminuição na prevalência de indivíduos que possuam sibilos, seja no decorrer de uma atividade física ou em algum momento da vida, esses sintomas podem estar intimamente associados com doenças alérgicas, em parte, isso poderia ser explicado pelo aumento e melhora dos programas de controle e prevenção dessas doenças, que facilitam o diagnóstico. Porém, houve um aumento no número de diagnósticos de diversas doenças alérgicas tais como asma, eczema flexural, rinite e rinoconjuntivite em quase todos os grandes centros do Brasil, o que pode estar relacionado com o aumento da poluição do ar, diminuição do contato com alérgenos na infância e exposição a fumaça do cigarro, mesmo que de forma passiva (SERPA et al., 2015). Com todos os avanços no diagnóstico e na velocidade de detecção das doenças alérgicas, o que resulta em maior rapidez no início do tratamento com melhora na qualidade de vida dos pacientes, estudos em capitais brasileiras mostraram crescimento nos índices de crianças com asma, rinite, tosse noturna e eczema revelando um grande caminho para o controle das doenças alérgicas (CASAGRANDE et al., 2008; 2015; SOLÉ et al., 2015).

Além disso, outra doença alérgica provocada por alérgenos respiratórios que tem se destacado em várias partes do mundo, incluindo o Brasil, é a polinose, que é desencadeada pela inalação de polens, com destaque para os polens oriundos de gramíneas da família *Poaceae*. Assim, como as outras doenças respiratórias, a polinose afeta a qualidade de vida e a produtividade de pessoas de todas as idades (SOPELETE et al., 2006; YAMADA; SAITO; FUJIEDA, 2014).

Rinite alérgica sazonal

A rinite alérgica sazonal, também chamada de polinose ou erroneamente denominada de febre do feno (pois não tem relação nenhuma com o feno e não é causadora de febre), é uma doença alérgica respiratória causada pela inalação do pólen presente no ar e que pode provocar diversos sintomas tais como: prurido nasal, espirros, coriza, congestionamento nasal, acompanhada frequentemente de hiperemia conjuntival. Os sintomas tendem a começar no início da primavera (setembro), período no qual há grande quantidade de polens liberada pelas plantas. No passado se acreditava que a rinite alérgica era uma condição exclusiva das vias aéreas, entretanto tem se mostrado uma patologia sistêmica com íntima relação com asma e dermatite atópica (BARTLE, 2016; CASTILLO VIZUETE et al., 2019; KAKLI; RILEY, 2016; PANDEY, 2016).

No Brasil, a rinite alérgica sazonal vem sendo estudada desde a década de 1940, época na qual se iniciou a contagem de aeroalérgenos em diversas regiões, como Sudeste e Sul, após a ocorrência dos primeiros casos de polinose. Foi verificado que essa doença alérgica ocorre com maior frequência em regiões que possuem estações climáticas bem definidas, que sofrem ação continental e que tem localização meridional elevada. Além disso, as taxas de sensibilização ao pólen variam em diferentes regiões de acordo com a distribuição de plantas alergênicas (ARAUJO; ROSARIO; MARI, 2016; MOREIRA et al., 2015).

1.2 Mecanismos de resposta imune inata e adaptativa no desenvolvimento de doenças alérgicas respiratórias

Como ilustrado na Figura 1, os alérgenos podem ultrapassar a barreira epitelial dos tecidos do trato respiratório ou se ligar diretamente as células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs) como macrófagos e células dendríticas, além de ativar e desenvolver células linfoides inatas (ILCs) do grupo 2 e células Th2 no local da lesão (EIFAN; DURHAM, 2016; MELUM et al., 2014; TAKETOMI et al., 2017). Em contato com o alérgeno, as APCs capturam, processam e apresentam os peptídeos via moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II). O MHC-II com o peptídeo antigênico se liga, respectivamente, ao CD4 e ao receptor de célula T (TCR) presente nas células T *helper naive* que poderão nesta fase proceder inicialmente o reconhecimento antigênico e em seguida, serem ativadas. Caso as células T CD4⁺ *naives* sejam ativadas mediante a liberação de IL-4 pelas APCs, que caracteriza o terceiro sinal da resposta imune, a IL-4 será responsável pela ativação do STAT 6 na célula T CD4⁺ *naives*, que por sua vez ativa o fator de transcrição GATA

3 (*GATA binding protein 3*), em conjunto com a reconhecimento antigênico (primeiro sinal da resposta imune) e a ligação de moléculas coestimulatórias (segundo sinal de ativação da resposta imune), levam ao desenvolvimento de células de perfil Th2 (BARNES, 2008; HO; PAI, 2007; HOLGATE; POLOSA, 2008) que irão expressar citocinas de perfil Th2 como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 que são típicas de doenças alérgicas (CHAPLIN, 2010; LARCHÉ; AKDIS; VALENTA, 2006).

Também é proposto um mecanismo alternativo de desenvolvimento das doenças alérgicas no qual as proteínas alergênicas, muitas vezes são enzimas com capacidade proteolítica ou lipopolissacarídeo (LPS) que podem atravessar a barreira epitelial. Esses alérgenos são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) como os receptores ativados por proteases (PARs) ou por receptores semelhantes ao Toll (TLRs) localizados nas células da barreira epitelial, juntamente com espécies reativas de oxigênio (ROS), podem danificar as células epiteliais, levando a um efeito pró-inflamatório que por sua vez favorece a produção de diversas citocinas como linfopoietina estromal tímica (TSLP), interleucina 25 (IL-25) e interleucina 33 (IL-33). IL 25 e IL-33 podem levar a uma regulação positiva de NF- κ B que em conjunto com TSLP ativam STAT-5 que promovendo o aumento na expressão de genes de perfil Th2, podem favorecer o desenvolvimento das doenças alérgicas (BULEK et al., 2010; DIVEKAR; KITA, 2015; GEORAS; REZAEI, 2014; LAMBRECHT; HAMMAD, 2014; TAKETOMI et al., 2017).

Quando são ativadas, as células Th2 alérgeno-específicos multiplicam-se e passam a secretar várias citocinas, dentre as quais, a IL-4 e IL-13, que induzem a mudança de isotipo de imunoglobulina produzida pela célula B, o qual passa então a sintetizar e secretar IgE específica, além de induzir proliferação de células inflamatórias. A IgE específica irá se ligar a receptores de alta afinidade em granulócitos (LARCHÉ; AKDIS; VALENTA, 2006; MIN, 2010), assim quando são novamente expostos a alérgenos, os indivíduos sensibilizados apresentam as reações alérgicas (GOSS et al., 2013).

A primeira fase da resposta alérgica é imediata (na primeira hora) devido a sensibilização dos granulócitos, principalmente basófilos e mastócitos, induzindo classicamente uma reação de hipersensibilidade do tipo I. Essas células estimuladas induzem sintomas de fase imediata por meio da liberação de mediadores pró-inflamatórios pré-formados, como histamina, heparina, cininas, triptase, entre outros. Em seguida, ocorre uma segunda reação, mais tardia, após 6 a 10 horas, a qual é responsável pelo aparecimento dos sintomas de

fase tardia devido a síntese e liberação de mediadores neoformados como prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, os quais podem durar de 6 a 24 horas, sendo então reduzida lentamente (JAMES; DURHAM, 2008).

Diferente da reação imediata, a quimiotaxia de eosinófilos é o mecanismo principal na reação tardia, causada por mediadores inflamatórios que são advindos da reação imediata que recrutam diversas células inflamatórias, tais como: mastócitos, linfócitos T e eosinófilos, os quais migram para o local (diapedese), rompendo e remodelando o tecido, causando diversos sintomas no indivíduo alérgico (MIN, 2010; STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2010).

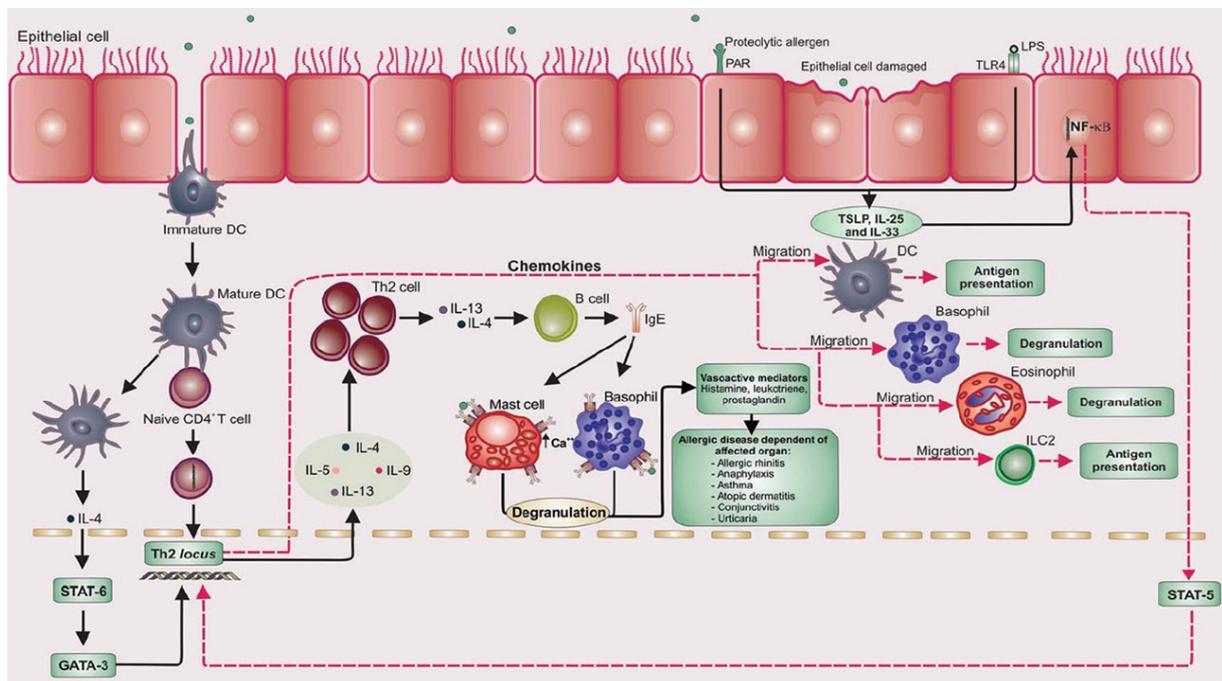


Figura 1. Resposta imune inata e adaptativa no desenvolvimento das doenças alérgicas

Fonte: (TAKETOMI et al., 2017)

1.3 Diagnóstico da alergia

O diagnóstico da alergia é realizado por meio de métodos *in vivo* (testes cutâneos de punção ou intradérmico) e/ou *in vitro* (determinação dos níveis de IgE sérica específica) que são úteis para a identificação da sensibilização de pacientes a um painel de alérgenos. Os testes cutâneos apresentam alta sensibilidade e especificidade, são de simples e rápida execução e mais econômicos quando comparado à determinação laboratorial da IgE sérica específica. Contudo, o teste cutâneo não diagnostica a doença alérgica, apenas determina a presença ou

ausência de anticorpos IgE alérgeno-específicos, importantes na patogênese da doença alérgica, e muitas vezes podem apresentar resultados falso-positivos (BALLMER-WEBER, 2014; OWNBY, 1988).

Os testes *in vitro* são preferencialmente utilizados, quando pacientes não podem ser submetidos ao teste cutâneo em virtude da presença de lesões cutâneas, ingestão de medicamentos ou história de possível anafilaxia. O resultado sendo positivo, assim como nos testes cutâneos, não é suficiente para o diagnóstico, é necessário ter associação com a clínica do paciente. Entretanto, vários estudos demonstram que a determinação dos níveis de IgE sérica específica a alérgenos inaláveis pode ser uma ferramenta valiosa no diagnóstico de pacientes alérgicos (BERINGS et al., 2017; BERNSTEIN; STORMS, 1995; MASTRANDREA et al., 1997).

1. 4 Imunoterapia específica com alérgenos

Com o constante aumento da prevalência das doenças alérgicas, novas alternativas têm sido buscadas para o tratamento das mesmas, com a finalidade de amenizar os sintomas desencadeados por respostas exacerbadas do organismo frente aos alérgenos, reduzindo assim o uso de farmacoterápicos (SCHEI; HESSEN; LUND, 2002).

Atualmente a imunoterapia específica com alérgenos (ITE), tem sido indicada para pacientes com doenças alérgicas mediadas por IgE, como rinite alérgica, asma leve e moderada e alergia a picada de himenópteros. ITE compreende a administração de quantidades gradualmente crescentes de alérgenos específicos até alcançar uma dose efetiva em reduzir a gravidade da doença atingindo a tolerância imunológica, mesmo mantendo a exposição natural ao alérgeno por vários anos de acordo com orientações médicas (BURKS et al., 2013; HUGGINS; LOONEY, 2004; KAKLI; RILEY, 2016).

A resposta imunológica durante a ITE envolve a produção precoce de anticorpos específicos da classe IgE e subclasse IgG1 na fase inicial da ITE, e posteriormente um aumento lento e contínuo nos níveis de anticorpos da classe IgA e subclasse IgG4 alérgeno-específicos, sendo que essa última imunoglobulina se torna predominante na ITE prolongada, impulsionada pela produção de citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- β por células T reguladoras (T-reg), além do aumento da expressão do fator de transcrição FOXP3, tudo isso em conjunto levam a supressão de células e citocinas de perfil Th2 (AKDIS; AKDIS, 2014; BOONPIYATHAD et al., 2019; PENG et al., 1992; SHAMJI; DURHAM, 2017).

Com a continuidade da imunoterapia com alérgenos em doses gradualmente crescentes até atingir a dose de manutenção, os níveis de IgG específica ao alérgeno tendem a subir até se estabilizarem em um platô. Os anticorpos IgG, principalmente da subclasse IgG4, induzidos pela ITE podem atuar como anticorpos bloqueadores do alérgeno, competindo com os anticorpos IgE na ligação com o alérgeno, bloqueando assim a ativação de mastócitos dependentes de IgE (AKDIS; AKDIS, 2014; KOWALSKI; JUTEL, 1998).

A ITE é considerada a principal e única terapia empregada para o tratamento específico das alergias e visa tratar a causa da doença, possibilitando assim a melhora no quadro alérgico mesmo após o tratamento ser descontinuado e envolve, de forma geral, os mecanismos como a indução de anticorpos bloqueadores, diminuição de citocinas de perfil Th2, mudança da resposta imune do tipo Th2 para Th1 e indução de tolerância pela geração de células Treg (DAHL et al., 2006; DURHAM; TILL, 1998; VALENTA, 2002).

Recentemente, Taketomi e colaboradores (2017) propuseram utilizar a dosagem sérica de anticorpos IgG específica aos alérgenos principais contidos na imunoterapia como uma ferramenta objetiva para efetuar o seguimento/monitoramento de pacientes com doenças alérgicas sob ITE aliado à avaliação clínica, tradicionalmente realizada por meio da redução do grau de intensidade e/ou da frequência dos sintomas clínicos, cuja avaliação é considerada como um parâmetro subjetivo.

Diante do impacto das doenças alérgicas na sociedade moderna, é importante o aprimoramento de estudos que envolvam novas estratégias para o tratamento, isto é, conhecer o papel e os mecanismos de ação dos anticorpos bloqueadores pode possibilitar o avanço e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que visem a melhoria na qualidade de vida dos pacientes.

1.5 Polens

Os grãos de pólen possuem em sua composição cerca de 4% a 12% de proteínas como globulinas, prolaminas, gluteminas e albuminas (STANLEY; LINSKENS, 1974). Por isso, pode haver significativa reatividade cruzada devido à grande similaridade entre as estruturas proteicas. Diante disso, sabe-se que por meio dos estudos taxonômicos quanto mais estreitamente relacionadas estão as plantas, maior será o número de antígenos compartilhados e maior a reatividade cruzada. Isso ocorre quando os anticorpos IgE são originalmente produzidos contra um alérgeno e depois se ligam a um peptídeo com similaridade presente em

outra fonte alergênica, isso dificulta ainda mais o diagnóstico da polinose (ALEKSIC et al., 2014; DREW et al., 2011; MIGUERES et al., 2014).

Nos últimos anos tem se observado um aumento no número de pacientes alérgicos. Pesquisas demonstram que cerca de 40% das crianças e 30% dos adultos em algum período de suas vidas serão afetados por alguma doença alérgica, sendo que mais de 25% da população europeia está acometida (MANDUZIO et al., 2012; PANDEY, 2016).

A rinite alérgica sazonal afeta em torno de 50% dos pacientes alérgicos ao redor do mundo, e os polens de árvores pertencentes às ordens Fabales, Fagales, Lamiales, Proteales e Pinales, bem como de palmeiras (Arecales) e gramíneas (Poales) estão dentre as fontes de aeroalérgenos mais importantes em todo o mundo, além de causar um grande impacto econômico, afinal cerca de 60% das faltas ao trabalho estão diretamente associadas a rinite alérgica. Muitas gramíneas têm sido estudadas e seus alérgenos caracterizados, conforme demonstrado na Tabela 1 (ASAM et al., 2015; CORTI et al., 2005; NECKEL et al., 2013).

Os grãos de polens de gramíneas apresentam uma ampla gama de proteínas com as mais diferentes estruturas e funções. Dentre essas proteínas, os alérgenos do grupo 1, que estão presentes em todas as subfamílias de Poaceae, e são denominados β -expansinas podem constituir até 10% de todo grão de pólen. Como representantes dessas proteínas se destacam, Lol p 1, Poa p 1 Phl p 1, que são extraídos de *Lolium perenne*, *Poa pratensis* e *Phleum pratense*, respectivamente. Outro grupo que se destaca são os alérgenos do grupo 5, alérgenos até hoje exclusivos da subfamília Pooideae. Por serem bastante importantes, esses dois grupos são considerados imunodominantes em polens de gramíneas, e apresentam alta reatividade com anticorpos IgE em diversos estudos. Outras proteínas importantes são os do grupo 13, os pan-alérgenos dos grupos 7 e 12 e ainda outros que possuem um reconhecimento menor tais como os grupos 2, 4, 23 e 24, como exemplificado na Tabela 1 (DAVIES et al., 2008; GARCÍA-MOZO, 2017; KAILAIVASAN; DAVIES, 2018; TIMBRELL et al., 2014).

O diagnóstico da polinose não é fácil, por isto diversas estratégias têm surgido para buscar um diagnóstico preciso. Recentemente, a IgE específica ao pólen foi demonstrada como um biomarcador precoce da rinite alérgica sazonal, o que é de grande valia, pois é possível ser identificada na maioria dos indivíduos antes do aparecimento dos primeiros sintomas alérgicos sazonais (HATZLER et al., 2014).

Tabela 1. Caracterização dos principais alérgenos presentes em gramíneas.

Fontes alergênicas	kDa	Alérgenos	
		Grupo	Nome bioquímico
<i>Poa pratensis</i>	33	Grupo 1	Beta expansina
	34	Grupo 5	-
<i>Lolium perenne</i>	27	Grupo 1	Beta expansina
	11	Grupo 2	-
	11	Grupo 3	-
	57	Grupo 4	-
	31	Grupo 5	-
	16	Grupo 11	Proteína relacionada à Ole e 1
<i>Phleum pratense</i>	27-28	Grupo 1	Beta expansina
	10-12	Grupo 2	Grupo gramínea II/III
	55	Grupo 4	Enzima ponte berberina
	32	Grupo 5	-
	11	Grupo 6	-
	6	Grupo 7	Polcacina
	20	Grupo 11	Proteína relacionada à Ole e 1
	14	Grupo 12	Profilina
55	Grupo 13	Poligalacturonase	
<i>Paspalum notatum</i>	29-30	Grupo 1	Beta expansina
<i>Cynodon dactylon</i>	32	Grupo 1	Beta expansina
	12	Grupo 7	Polcacina
	14,5	Grupo 12	Profilina
	9	Grupo 15	-
	-	Grupo 22w	Enolase
	9	Grupo 23	-
	21	Grupo 24	PR-1 (proteína relacionada à patogênese)
<i>Sorghum halepense</i>	30-35	Grupo 1	Beta expansina
	12	Grupo 2	Beta expansina
	54-55	Grupo 13	Exopoligalacturonase (Glicosil hidrolase 28)
<i>Lolium multiflorum</i>	-	Grupo 5	-

Fonte: (ALLERGEN, 2010)

1.6 *Lolium multiflorum* (Lm)

Lolium multiflorum (Lm) popularmente conhecida como azevém italiano, no inglês *Italian ryegrass*, é uma planta da família Poaceae, subfamília Pooideae e tribo Poeae, que foi trazida por imigrantes europeus para o Brasil (BERNARDES et al., 2010; ESTEVES et al., 2000).

O pólen (gameta masculino) dessa espécie tem sido considerado uma das principais fontes de alérgenos com potencial para sensibilizar pacientes, o que pode estar ligado à sua ampla utilização na pecuária por ser de baixo custo, grande capacidade de produção de grãos de pólen e propagação em diversos ambientes. No Sul do Brasil, como já relatado na literatura,

os sintomas nos indivíduos alérgicos tendem a começar no mês de setembro que marca o início da primavera, e declinar a partir dos meses de novembro e dezembro (BERNARDES et al., 2010; MOREIRA et al., 2015; SOPELETE et al., 2006). Um recente estudo, mostrou que *L. multiflorum* está intimamente ligada a outras espécies de plantas produtoras de polens, como *Phleum pratense*, apresentando reatividade cruzada de anticorpos IgE de até 95% com os antígenos dessa espécie (BERNARDES et al., 2010; MOREIRA et al., 2015; SOPELETE et al., 2006; VIEIRA; FERREIRA; MATTER, 2005).

Diante disso, alguns estudos têm demonstrado que o pólen de *L. multiflorum* tem sensibilizado muitos indivíduos no Brasil, sendo que a incidência da polinose está intimamente relacionada com a frequência de pólen dessa espécie presente no ar (ARAUJO; ROSARIO; MARI, 2016; BONISSONI; NETO, 2016)

A literatura ainda tem pouca informação em relação aos alérgenos específicos de *L. multiflorum* conforme a Tabela 1, e de fato apenas um alérgeno dessa espécie foi relatado, o Lol m 5, entretanto não há nenhuma caracterização deste alérgeno, dificultando assim o diagnóstico e o tratamento específico de indivíduos alérgicos sensibilizados aos alérgenos derivados de Lm (MOHAPATRA; LOCKEY; SHIRLEY, 2005).

1.7 Identificação de isoformas antigênicas para aplicações laboratoriais

Diferentes estudos têm ressaltado a importância da identificação e caracterização de um repertório mais amplo de alérgenos bem como de suas possíveis isoformas que apresentam reconhecimento frente a soros de pacientes alérgicos. Em estudo conduzido recentemente, foi feita a identificação e caracterização de isoformas alergênicas de veneno da serpente *Protobothrops mucrosquamatus* por meio da eletroforese e *Immunoblotting* bidimensional, que possibilitaram o emprego da espectrometria de massa desvelando assim a sequência proteica dos alérgenos em questão (HU et al., 2017). De forma análoga, em trabalho realizado por Rosmilah et al. (2013) foi feita a investigação dos alérgenos do peixe *Thunnus tonggol* com o objetivo de caracterizar as proteínas alergênicas, utilizando para isto a mesma metodologia de trabalho citado anteriormente (GEILFUS et al., 2015; LI et al., 2003; ROSMILAH et al., 2013; WANG et al., 2016).

Em estudo semelhante realizado com o extrato de pólen, incluindo integrantes do gênero *Lolium* foi identificado alérgenos e isoformas alergênicas do grupo 1 e grupo 5 que constituíam múltiplos isoalérgenos (CORTI et al., 2005), uma vez que uma pequena mudança na sequência

dos aminoácidos pode induzir modificações no reconhecimento dos epítomos pelas células B (BREITENEDER et al., 1993).

Diante disto, metodologias como a eletroforese e o *Immunoblotting* bidimensional podem contribuir para a identificação de novas proteínas alergênicas e suas possíveis isoformas oriundas de fontes de alérgenos inaláveis como o pólen de *L. multiflorum*, que apresentam evidente padrão de reconhecimento pelo soro de pacientes alérgicos, viabilizando assim o emprego de tais alérgenos em técnicas sorológicas que quantifiquem anticorpos específicos presentes em pacientes com alergias respiratórias, e também no acompanhamento laboratorial de indivíduos que apresentam alergia respiratória e que estejam sob imunoterapia.

1.8 Purificação de proteínas para aplicação na detecção da alergia

As plantas possuem diversos tipos de alérgenos com capacidade para sensibilizar os indivíduos, dentre esses, o grupo das β -expansinas pode ser isolado e é um possível alvo para ser usado tanto no diagnóstico como na ITE. As β -expansinas são proteínas de cerca de 30 kDa, responsáveis por auxiliar no relaxamento e extensão da parede celular das plantas, por isso desempenham papéis fundamentais na organogênese, filotaxia, amadurecimento de frutos, crescimento de raízes, dentre outros. Essas proteínas são ativas na parede celular quando o pH é baixo (4,5), por isso sua atividade pode ser influenciada por fatores ambientais e hormonais. Após serem identificados, esses alérgenos recebem um nome com as iniciais das três letras do gênero e uma letra da espécie da planta, seguido do número referente ao grupo em que se enquadram, como por exemplo a β -expansina de *Lolium perenne*, que é denominada de Lol p 1 (GEILFUS et al., 2015; JIN et al., 2006; LI et al., 2003; MAROWA; DING; KONG, 2016; WANG et al., 2016).

As β -expansinas se destacam há mais de meio século, pois são alvos de investigação e consideradas as principais responsáveis pela polinose e asma sazonal induzida por pólen de gramíneas. Recentemente, uma pesquisa conseguiu o isolamento de quatro isoformas de β -expansinas do pólen de *Zea mays* (*milho*) através da técnica de cromatografia de troca iônica em colunas de carboximetil (CM) Sepharose juntamente com HPLC. Ainda em relação a esses alérgenos, pesquisadores conseguiram isolar três isoformas de β -expansinas de 29 kDa do pólen *Paspalum notatum* (grama da Bahia), as quais apresentaram reatividade em aproximadamente de 91% com anticorpos da classe IgE presentes em soros de indivíduos alérgicos ao pólen de *Paspalum notatum*. Assim, têm-se demonstrado que as β -expansinas são essenciais na sensibilização alergênica, e que podem constituir a chave para o diagnóstico e tratamento da

rinite alérgica sazonal e outras doenças alérgicas (DREW et al., 2011; LI et al., 2003; MALLEY; REED; LIETZE, 1962).

Assim, é de extrema relevância o conhecimento de novos componentes alergênicos e/ou antigênicos de *L. multiflorum* que possuam importância clínica no Brasil, e que ainda não foram descritos na literatura. Neste contexto, a pesquisa da reatividade de diferentes isotipos de anticorpos presentes no soro de pacientes alérgicos contra estes componentes torna-se de suma importância para colaborar na avaliação da participação individual de potenciais alérgenos específicos de *L. multiflorum*, tanto na imunogenicidade quanto na alergenidade, a ser observada em pacientes com polinose.

2. Hipóteses

H0: O potencial alergênico e imunogênico da fração proteica de *L. multiflorum* reconhecidos por meio dos anticorpos IgE e IgG4 de pacientes alérgicos é inferior ao extrato total de polens de *L. multiflorum*.

H1: O potencial alergênico e imunogênico da fração proteica de *L. multiflorum* reconhecidos por meio dos anticorpos IgE e IgG4 de pacientes alérgicos é similar ao extrato total de polens de *L. multiflorum*.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Identificar componentes imunodominantes derivados do extrato total de *L. multiflorum* e de sua fração de *L. multiflorum* obtida por cromatografia de troca iônica, que possuam potencial aplicação tanto para o diagnóstico de alergias quanto para a imunoterapia específica com alérgenos (ITE).

3.2 Objetivos específicos

- Fazer a extração do extrato proteico de grãos de polens *L. multiflorum* de polens coletados no Sul do país.
- Eluir uma fração a partir do extrato proteico total de *L. multiflorum* por cromatografia de troca iônica em uma coluna de CM-Sepharose
- Quantificar os níveis de anticorpos IgE e IgG4 específicos a *L. multiflorum* por ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) no soro de pacientes alérgicos e indivíduos controles;
- Identificar por *Immunoblotting* os principais componentes alergênicos/antigênicos do extrato de *L. multiflorum* reconhecidos por anticorpos IgE e IgG4 do soro de pacientes alérgicos e indivíduos controles;
- Comparar a reatividade de anticorpos da classe IgE e IgG4 entre o extrato proteico total de *L. multiflorum* (S1) e a fração eluída (S2) em indivíduos alérgicos por meio das técnicas de ELISA e *Immunoblotting*.

4. Materiais e Métodos

4.1 Seleção de pacientes com rinite alérgica sazonal e indivíduos controles

Foram selecionados em Caxias do Sul, RS, 46 pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18 e 57 anos apresentando rinite alérgica sazonal e ELISA-IgE positivo para o extrato de polens de *L. multiflorum*. Também foram selecionados, 16 indivíduos com TCP e ELISA-IgE negativos para o extrato de *L. multiflorum* na cidade de Uberlândia, MG.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (número de protocolo 3.342.127), sendo que a concordância em participar da pesquisa foi confirmada pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) e a avaliação do histórico clínico foi realizada por meio do questionário clínico, o qual foi aplicado por médico responsável pelo atendimento.

4.2 Preparação do extrato alergênico de polens de *Lolium multiflorum*

Os grãos de pólen da gramínea *L. multiflorum*, tiveram sua coleta realizada na região rural do município de Caxias do Sul no Estado do Rio Grande do Sul, pelo Dr. Francisco de Assis Machado Vieira no período de florescimento (setembro - dezembro, 2017) do azevém italiano. Após isso, os polens foram mantidos em sala especial para secagem e coleta em papel branco. Posteriormente, o gameta masculino de *L. multiflorum* foi colocado em tubo de ensaio e enviados ao Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia. A extração antigênica foi realizada de acordo com Sopenete et al. (2006). As frações antigênicas foram extraídas de 500 mg de grãos de pólen adicionando-se 4,5 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,01 M, pH 7,2, e adição do coquetel de inibidores de proteases (PMSF 1,6 mM, leupeptina 100 µg/mL, aprotinina 10 µg/mL). Essa mistura foi macerada sob o gelo e então submetida à extração durante 18 h a 4°C sob agitação orbital. Posteriormente, o material foi centrifugado a 15.000 xg a 4°C durante 30 minutos e dialisado contra PBS overnight. Após incubação, centrifugação e diálise, o extrato proteico final foi mantido em tubo de armazenamento a -70°C para uso nos testes. A concentração protéica do extrato alergênico de *L. multiflorum* (S1) foi determinada segundo o método de Bradford, utilizando soroalbumina bovina como padrão, em A₅₉₅. Para o teste cutâneo de puntura, o extrato foi diluído em glicerina a 50%, em uma concentração final de 1 mg de proteína/mL.

4.3 Cromatografia de Troca Iônica

O protocolo de purificação de β -expansinas por cromatografia de troca iônica foi realizado de acordo com Li *et al* (2003). O extrato proteico de polens *L. multiflorum* (S1) foi centrifugado a 15.000xg a 4°C por 10 minutos em tubos e depois dialisado em tampão de equilíbrio (citrato de sódio 20mM - pH 4,5) *overnight*. A coluna (CM-Sepharose) foi então lavada com água Mili-Q (6x o volume da coluna) e equilibrada com o tampão de equilíbrio (citrato de sódio 20mM - pH 4,5, 4x o volume da coluna). Posteriormente, a coluna foi carregada com o extrato S1 dialisado em tampão de equilíbrio (citrato de sódio 20mM - pH 4,5) na concentração de 1mg/mL por mL de coluna, e então lavada em tampão de equilíbrio (citrato de sódio 20mM - pH 4,5) até atingir o valor basal em A_{280} . Na sequência, a coluna foi eluída com tampão de eluição (citrato de sódio 20mM, NaCl 200 mM pH 4,5) a uma velocidade média de 2 mL min⁻¹ e o eluído foi coletado em tubos para leitura em A_{280} em espectrofotômetro de microplacas *Epoch* (BioTek Instruments, Inc., VT, EUA). As proteínas da fração extraídas a 200 mM de NaCl (S2) foram concentradas e dialisadas contra PBS e depois quantificadas segundo o método de *Bradford*, utilizando soroalbumina bovina como padrão e a leitura realizada em A_{595} .

4.4 Teste Cutâneo de Puntura

O teste cutâneo de puntura para análise da hipersensibilidade imediata foi realizado de acordo com Ownby (1988). Foram utilizados extratos de alérgenos de ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae* e *Blomia tropicalis*), epitélios de cão (*Canis familiaris*), gato (*Felis domesticus*), barata (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*), além de fungo (*Alternaria alternata*), e de pólen de diversas gramíneas (*Cynodon dactylon*, *Paspalum notatum*, *Lolium perene* e *Lolium multiflorum*). Como controle negativo foi utilizado solução salina fisiológica com glicerol a 50%, e como controle positivo foi utilizado cloridrato de histamina (10 mg/mL) diluído na mesma solução do controle negativo. As punturas foram realizadas com lancetas apropriadas na face interna do antebraço sobre as gotas (10 μ L) de cada extrato alergênico (FDA Allergenic/Immunotech, Rio de Janeiro, RJ), mantendo-se uma distância de 3 cm entre os extratos. A leitura do teste foi realizada após 15 minutos e um tamanho médio de pápula igual ou superior a 3 mm do valor da pápula obtida com o controle negativo foi considerado positivo (OWNBY, 1988).

4.5 Coleta de sangue

Foram obtidas amostras de sangue de cerca de 20 mL de cada indivíduo por meio de punção venosa na região do antebraço, na mesma ocasião da realização dos testes cutâneos de puntura. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 700 x g por 10 minutos. Os soros obtidos foram distribuídos em alíquotas e armazenados a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

4.6 ELISA para detecção de IgE sérica específica a *L. multiflorum*

Os anticorpos da classe IgE séricos específicos a *L. multiflorum* foram dosados pela técnica convencional (cELISA), como já descrito na literatura (PEREIRA et al., 2005). Nesse ensaio, as placas de alta afinidade (Corning® 96-well EIA/RIA Clear Flat Bottom Polystyrene High Bind Microplate, Individually Wrapped, without Lid, Nonsterile) foram sensibilizadas com o extrato S1 ou a fração S2 na concentração de 20 µg/mL *overnight* a 4 °C. As placas foram lavadas com PBS acrescido de Tween a 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T adicionado de soroalbumina bovina (BSA) 1% por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foi utilizado PBS-T-BSA 1% como diluente a cada etapa da reação e as placas foram lavadas com PBS-T após cada etapa da reação. As amostras de soros foram diluídas a 1:2 e incubadas a 37°C por duas horas em câmara úmida. Subseqüentemente, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgE humana biotinizada (1:1000; Sigma-Aldrich) por 1 hora a 37°C. Na etapa final, o conjugado estreptavidina-peroxidase foi adicionado na diluição de 1:500 durante 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi revelada por meio da adição de 2,2'-diazino do ácido etil-benzotiazolino sulfônico (ABTS; Sigma-Aldrich) a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% água oxigenada. A densidade óptica (D.O.) foi determinada a 405 nm em espectrofotômetro de microplacas *Epoch* (BioTek Instruments, Inc., VT, EUA). Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.).

4.7 ELISA para detecção de IgG4 específica a alérgenos do pólen *L. multiflorum*

Os anticorpos da subclasse IgG4 séricos específico a *L. multiflorum* foram dosados pela técnica convencional (cELISA), como já descrito na literatura (PEREIRA et al., 2005). Neste ensaio, as placas de alta afinidade foram sensibilizadas com o extrato alergênico total S1 ou a fração alergênica S2 na concentração de 20 µg/mL. As placas foram lavadas com PBS acrescido de Tween a 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T adicionado de soroalbumina bovina (BSA) 1% por 1 hora à temperatura ambiente. Foi utilizado PBS-T-BSA 1% como diluente e as placas foram lavadas com PBS-T após cada etapa da reação. As amostras de soros foram

diluídas a 1:5 e incubadas a 37°C por uma hora em câmara úmida. Subsequentemente, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG4 humana biotinizada (1:1000; Sigma-Aldrich) por 1 hora a 37°C. Na etapa final, o conjugado estreptavidina-peroxidase foi adicionado na diluição de 1:1000 durante 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi revelada por meio da adição de 2,2'-diazino do ácido etil-benzotiazolino sulfônico (ABTS; Sigma-Aldrich) a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% água oxigenada. A densidade óptica (D.O.) foi determinada a 405 nm em espectrofotômetro de microplacas *Epoch* (BioTek Instruments, Inc., VT, EUA). Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.).

4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional (SDS-PAGE)

A fim de demonstrar os principais componentes antigênicos do extrato total S1 e da fração S2 foram realizadas as técnicas de eletroforese vertical em gel de separação de poliacrilamida a 14% e em gel de empilhamento a 4% (SDS-PAGE) como descrito previamente por Laemmli (1970). As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M pH 6,8; SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2%, glicerol a 20%) e incubadas a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente, foram submetidas à SDS-PAGE e comparadas com padrões de pesos moleculares. Em seguida, os géis foram submetidos à coloração com *Coomassie blue* e posteriormente, digitalizados em equipamento *ChemiDoc™ XRS+ System* e analisados em software *Image Lab™* (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA) (LAEMMLI, 1970).

4.9 Eletrotransferência para membranas de nitrocelulose

O extrato S1 e a fração S2 foram submetidos à eletroforese vertical em SDS-PAGE e eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose (0,45 µm, Millipore, Bedford, EUA), utilizando sistema semi-úmido de transferência (Multiphor II Electrophoresis Unit, Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia) conforme já descrito na literatura (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). As membranas foram cortadas em tiras de 0,3 mm e então submetidas à reação de *Immunoblotting*.

4.10 Immunoblotting para detecção de anticorpos IgE e IgG4 específicos

Primeiramente as tiras foram bloqueadas com PBS-T acrescida de leite desnatado a 2% por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as tiras utilizadas para detectar a reatividade de anticorpos IgE foram incubadas com amostras de soros diluídas em PBS-T acrescida de leite desnatado a 1% (PBS-T-M), na diluição de 1:2 para detecção de anticorpos da classe IgE *overnight* a 4°C, sob agitação lenta. Após cada etapa da reação, as tiras foram lavadas com PBS-T por 5 vezes durante 5 min. Em seguida, as tiras foram incubadas com

anticorpo secundário anti-IgE humano biotilado (1:500), diluídos em PBS-T-M por 2 h à temperatura ambiente. Após novas lavagens, as tiras foram incubadas com o complexo estreptavidina-peroxidase (HRP, Dako Corporation, Carpinteria, EUA) diluído a 1:500 em PBS-T-M por 1 h à temperatura ambiente. Após a etapa de lavagem final, as bandas foram visualizadas através da revelação por DAB (3'3-tetrahydrocloro de diaminobenzidina, Sigma-Aldrich), e então as tiras foram digitalizadas em equipamento *ChemiDoc™ XRS+ System* e analisados em *software Image Lab™* (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA).

A fim de avaliar a reatividade de anticorpos IgG4, as tiras foram incubadas com amostras de soros diluídas em PBS-T-M, na diluição de 1:5 para detecção de anticorpos da classe IgG4 *overnight* a 4°C, sob agitação lenta. Após cada etapa da reação, as tiras foram lavadas com PBS-T por 5 vezes durante 5 min. Em seguida, as tiras foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG4 humano biotilado (1:1000), diluídos em PBS-T-M por 2 h à temperatura ambiente. Após novas lavagens, as tiras foram incubadas com o complexo estreptavidina-peroxidase (HRP, Dako Corporation, Carpinteria, EUA) diluído a 1: 500 em PBS-T-M por 1 h à temperatura ambiente. Após a etapa de lavagem final, as bandas foram visualizadas através da revelação por DAB (3'3-tetrahydrocloro de diaminobenzidina, Sigma-Aldrich), e então as tiras foram digitalizadas em equipamento *ChemiDoc™ XRS+ System* e analisados em *software Image Lab™* (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA).

4.11 Análise estatística

A análise estatística do trabalho foi realizada através do *software GraphPad Prism* versão 6.0 (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, EUA). Foi utilizado o teste de Chi-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher, quando apropriado, a fim de analisar gênero, TCP e diagnóstico. As frequências das bandas antigênicas reconhecidas pelos anticorpos séricos nos géis foram submetidas a análises comparativas entre duas proporções pela estatística Z. Foi realizado o teste de Mann–Whitney para avaliar idade, tamanho médio das pápulas e o teste de ELISA. Todos os resultados foram considerados significativos a um nível de significância de $P < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Caracterização demográfica e clínica dos pacientes

Os indivíduos foram divididos em dois grupos, o grupo atópico (AT) e o grupo não atópico (NAT) de acordo com resultados do TCP e do teste de ELISA para anticorpos da classe IgE. As características demográficas e clínicas dos indivíduos incluídos no estudo estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. Características demográficas e clínicas dos pacientes.

Aspecto	Atópicos	Não- atópicos	Valor de P
n	46	16	
Gênero			<0,0001****a
<i>Masculino</i>	20 (43,4%)	2 (12,5%)	
<i>Feminino</i>	26 (56,6%)	14 (87,5%)	
Idade			0,1469 ^b
<i>Mediana</i>	29,5 (18-57)	21 (20-57)	
Pápula (mM)			<0,0001****b
<i>Lm*</i>	11	0	
TCP			<0,0001****a
<i>Positivo</i>	44 (95,6%)	0 (0%)	
<i>Negativo</i>	2 (4,4%)	16 (100%)	
Diagnóstico Clínico			<0,0001****a
<i>Rinite</i>	11 (23,9%)	7 (43,7%)	
<i>Rinite e conjuntivite</i>	33 (71,7%)	0	
<i>Rinite, asma e conjuntivite</i>	1 (2,2 %)	0	
<i>Nenhum</i>	1 (2,2%)	9 (56,3%)	

L. multiflorum (*Lm*), Teste cutâneo de puntura (TCP), * p <0,05, **** p <0,0001, ^a Teste Chi-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher, quando apropriado; ^b Teste de Mann–Whitney;

O grupo de pacientes AT foi representado por 43,4% de indivíduos do sexo masculino, enquanto a frequência de indivíduos do sexo feminino foi de 56,6%. O grupo NAT está representado por 12,5% de indivíduos do sexo masculino, enquanto o grupo de indivíduos do sexo feminino está majoritariamente representado com 87,5%, apresentando diferença

significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). A mediana de idade do grupo AT foi de 29,5 anos com intervalo de 18 a 57 anos de idade, enquanto o grupo NAT apresentou mediana de 21 anos com intervalo de 20 a 57 anos de idade, porém não houve diferença estatística entre os grupos ($p = 0,1469$).

A fim de determinar a reatividade ao extrato de polens de Lm foi realizado o TCP dos pacientes. No grupo de indivíduos AT, 95,6 % dos indivíduos apresentaram positividade ao teste, enquanto o grupo NAT, todos os indivíduos foram negativos quando submetidos ao extrato de Lm.

Posteriormente, os indivíduos foram submetidos ao teste de diagnóstico pelo questionário ISAC (Anexo 2 e 3) e análise clínica. No grupo AT 23,9% dos indivíduos foram diagnosticados com rinite, enquanto o diagnóstico de rinite e conjuntive foi o diagnóstico mais comum com 71,7%, asma, rinite e conjuntivite e nenhum, ambos foram os menos prevalentes com 2,2%. No grupo NAT, 43,7% dos indivíduos foram diagnosticados com rinite, enquanto 56,3% não apresentaram nenhuma patologia avaliada.

5.2. Dosagem proteica

A concentração proteica do extrato S1 e da fração S2 revelou uma concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}$ no extrato S1 enquanto na fração S2 foi encontrada uma concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$.

5.3. Cromatografia de troca iônica

As amostras eluídas após a cromatografia de Troca Iônica em coluna CM (carboximetil) Sepharose foram analisadas em relação a absorbância a 280 nm, conforme ilustrada na figura 2. No pico 1 estão representadas as amostras que foram eluídas por não se ligaram à coluna CM Sepharose, já no pico 2 (tubos 10 a 13) são demonstradas as amostras que se ligaram na coluna e foram eluídas a 200 mM de NaCl, até que atingisse o valor basal da coluna. Em 3 está demonstrado as proteínas que foram eluídas a 200 mM de NaCl, mas que não foram utilizadas, devido à baixa concentração proteica.

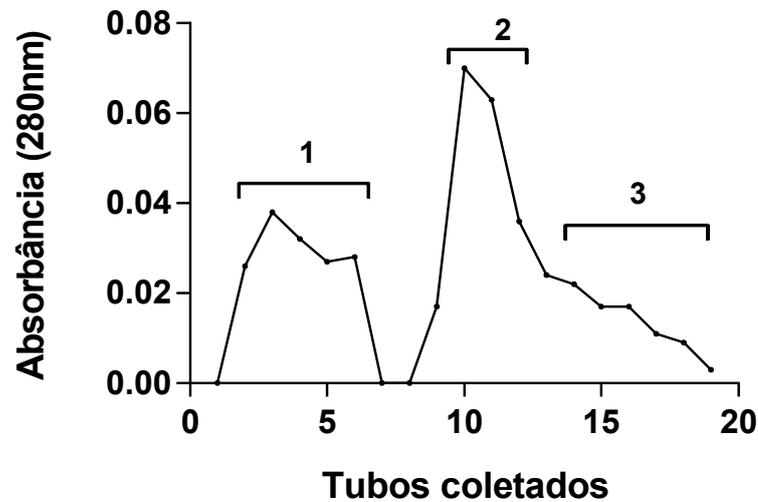


Figura 2: Cromatografia de troca iônica em coluna CM (carboximetil) Sepharose. Pico 1, estão representadas as proteínas não ligadas (VOID) a coluna; Pico 2 estão representadas as amostras da fração eluídas a 200 mM de NaCl que foram utilizadas. Em 3 estão representadas as amostras da fração eluídas a 200 mM de NaCl que não foram utilizadas. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 280 nm. Os valores de absorbância estão expressos em Densidade Óptica (D.O.).

5.4. Perfil eletroforético do extrato S1 e da fração S2 separados por eletroforese

O perfil de bandas de extrato S1 e da fração S2 foi analisado por meio de eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 14% e corado com *Coomassie blue*. As principais bandas identificadas no extrato S1 foram de 145, 102, 79, 69, 58, 47, 43, 38, 36, 32, 29, 26, 24, 18, 17 e 12 kDa, em que as bandas de 58, 32 e 12 kDa se destacaram pela intensidade. Por outro lado, a fração S2 quando submetida a SDS-PAGE a 14% e corada com *Coomassie blue* revelou as bandas de 69, 58, 47, 43, 36, 32, 29 e 12 kDa, com destaque para a banda de 32 kDa, como pode ser visto na figura 3.

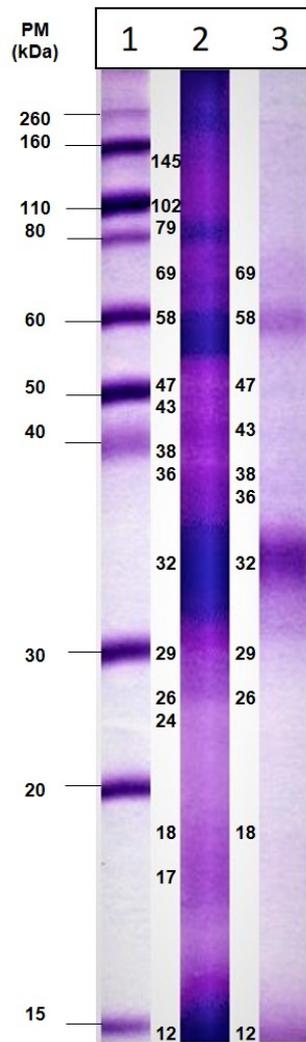


Figura 3. Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 14%, corados por *Coomassie blue*. (1) Linha 1, padrão de peso molecular em kiloDaltons (kDa); (2) Linha 2, extrato total do pólen de *Lolium multiflorum* (S1), (3) Linha 3, fração de *L. multiflorum* eluída a 200 mM de NaCl por cromatografia de troca iônica (S2).

5.5. Níveis de anticorpos da classe IgE específicos ao extrato S1 e fração S2

Para avaliar o perfil de reatividade de anticorpos da classe IgE frente ao extrato S1 e à fração S2, foi realizado o teste de ELISA com o soro de pacientes AT (n = 46) e NAT (n = 16), (figura 4).

Os níveis de anticorpos da classe IgE foram significativamente maiores ($p < 0,0001$), em soros de indivíduos AT (mediana = 1,18; positividade de 100%), quando comparados a soros de indivíduos NAT (mediana = 0,15; positividade de 0%) frente ao extrato S1. Todos os indivíduos NAT apresentaram níveis de anticorpos da classe IgE abaixo do limite de positividade (0,2). Da mesma forma, na fração S2, os níveis de anticorpos da classe IgE foram

significativamente maiores ($p < 0,0001$) em soros de indivíduos AT (mediana = 1,19; positividade de 95,6%), quando comparados aos soros de indivíduos NAT (mediana = 0,09; positividade de 0%). Assim, todos os pacientes AT foram IgE-positivos enquanto que 4,4% (46/2) destes pacientes foram IgE-negativos à fração S2. No entanto, como mostrado na Figura 4C, uma forte correlação ($r = 0,9482$; $p < 0,0001$) foi encontrada quando se comparou a reatividade dos anticorpos IgE séricos ao extrato S1 e à fração S2 de todos os indivíduos, AT e NAT, por meio do teste de ELISA.

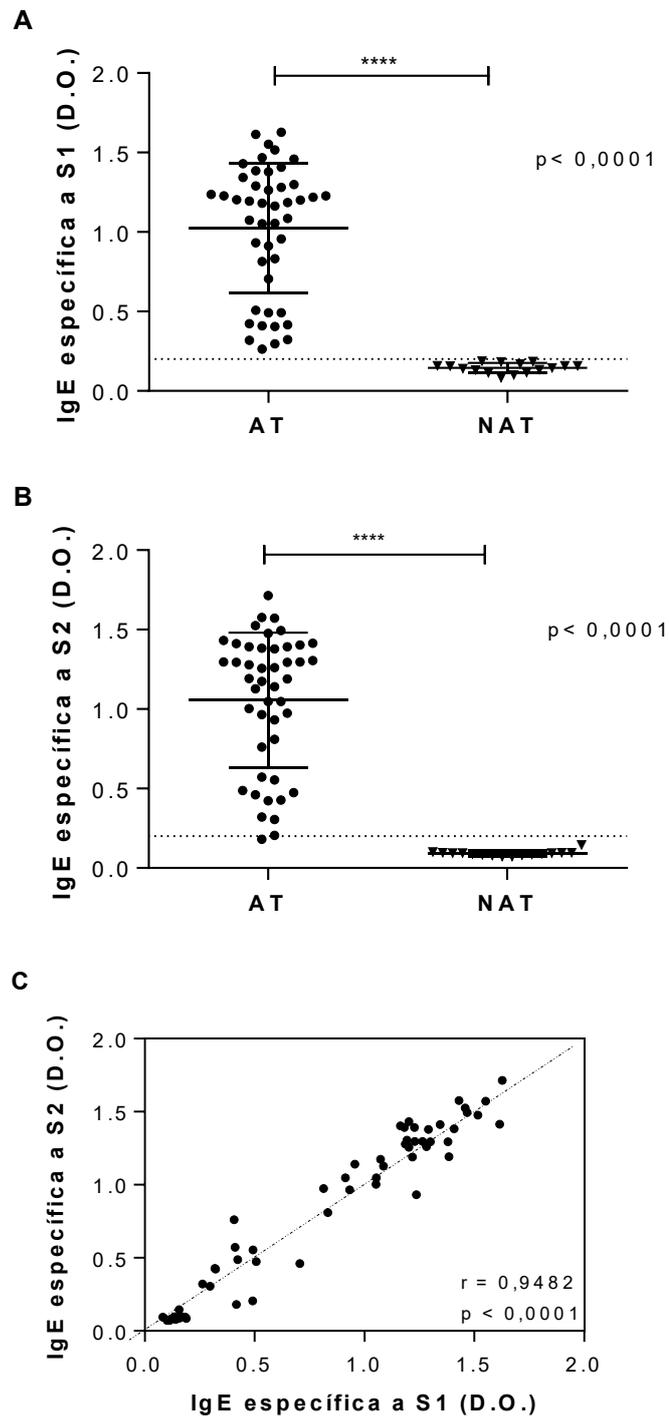


Figura 4. Níveis séricos de anticorpos IgE específicos ao extrato total de polens de *Lolium multiflorum* (Lm) (S1) e à fração de Lm (S2), determinados por ELISA, em indivíduos atópicos (AT) e não-atópicos (NAT) estão representados em (A) e (B), respectivamente. Em (C) é demonstrada a correlação entre os níveis de anticorpos IgE específicos ao extrato total (S1) e à fração (S2). Os valores estão expressos em Densidade Óptica (D.O.). As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste *Mann-Whitney*. A correlação foi analisada pelo teste de *Spearman*. As barras horizontais indicam a mediana e a linha tracejada indica o valor do *cut-off* (0,2). Os valores de “p” foram considerados significativos quando $< 0,05$ (**** $p < 0,0001$).

5.6. Níveis de anticorpos da subclasse IgG4 específicos ao extrato S1 e à fração S2

Para avaliar o perfil de reatividade de anticorpos da subclasse IgG4 frente ao extrato S1 e à fração S2, foi realizado o teste de ELISA no soro de pacientes AT (44) e NAT (12), devido a insuficiência de soros biológicos de alguns indivíduos, os resultados da análise estão demonstrados na figura 5.

Os níveis de anticorpos da subclasse IgG4 específicos ao extrato S1 foram significativamente maiores ($p = 0,0019$), em soros de indivíduos AT (mediana = 0,68) quando comparados a soros de indivíduos NAT (mediana = 0,28). Da mesma forma, os níveis de anticorpos da subclasse IgG4 específicos à fração S2 foram significativamente maiores ($p = 0,0173$) em soros de indivíduos AT (mediana = 0,77) quando comparados aos soros de indivíduos NAT (mediana = 0,32). Da forma similar aos resultados obtidos para anticorpos IgE, também foi mostrado conforme figura 5C, uma forte correlação ($r = 0,9216$) quando se comparou a reatividade dos anticorpos IgG4 séricos ao extrato S1 e à fração S2 pelo teste ELISA, incluindo todos os indivíduos AT e NAT, avaliados para IgG4.

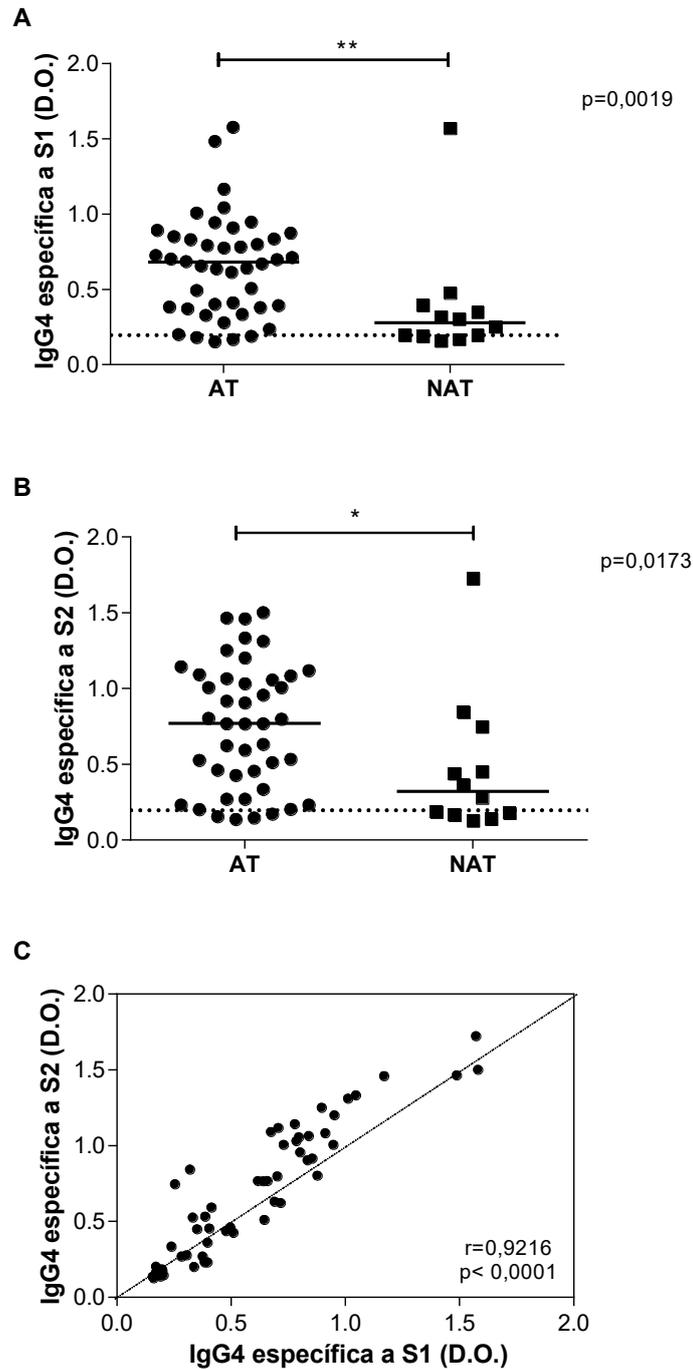


Figura 5. Níveis séricos de anticorpos da subclasse IgG4 específicos ao extrato total de polens de *L. multiflorum* (S1) e à sua fração (S2), avaliados por ELISA, em indivíduos atópicos (AT) e não-atópicos (NAT) estão demonstrados em (A) e (B), respectivamente. Em (C) está mostrada a correlação entre os níveis de anticorpos IgG4 específicos ao extrato total S1 e à fração S2. Os valores estão expressos em densidade óptica (D.O.). As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste *Mann-Whitney*. A correlação foi analisada pelo coeficiente de *Spearman*. As barras horizontais indicam a mediana e a linha tracejada indicam o valor do *cut-off* (0,2). Os valores de “p” foram considerados significativos quando $< 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.7. Perfil de reatividade de anticorpos IgE aos componentes alergênicos do extrato S1 e da fração S2 separados por eletroforese

A análise de reatividade dos anticorpos IgE específicos aos componentes tanto do extrato S1 quanto da fração S2 foi feita, por *immunoblotting*, em 35 soros de indivíduos do grupo AT divididos em 7 pools constituídos por 5 soros cada, classificados progressivamente de acordo com a D.O. individual obtida por ELISA e 1 *pool* com 5 soros de indivíduos do grupo NAT. As imagens representativas do *immunoblotting* para a reatividade de anticorpos da classe IgE em três pools de soros de pacientes AT e em um pool de soro de indivíduos NAT dirigida contra os componentes do extrato S1 e da fração S2 estão demonstradas, respectivamente, na Figura 6A e Figura 6B. Os soros de indivíduos do grupo NAT não mostraram nenhuma reatividade de IgE frente ao extrato S1 e à fração S2.

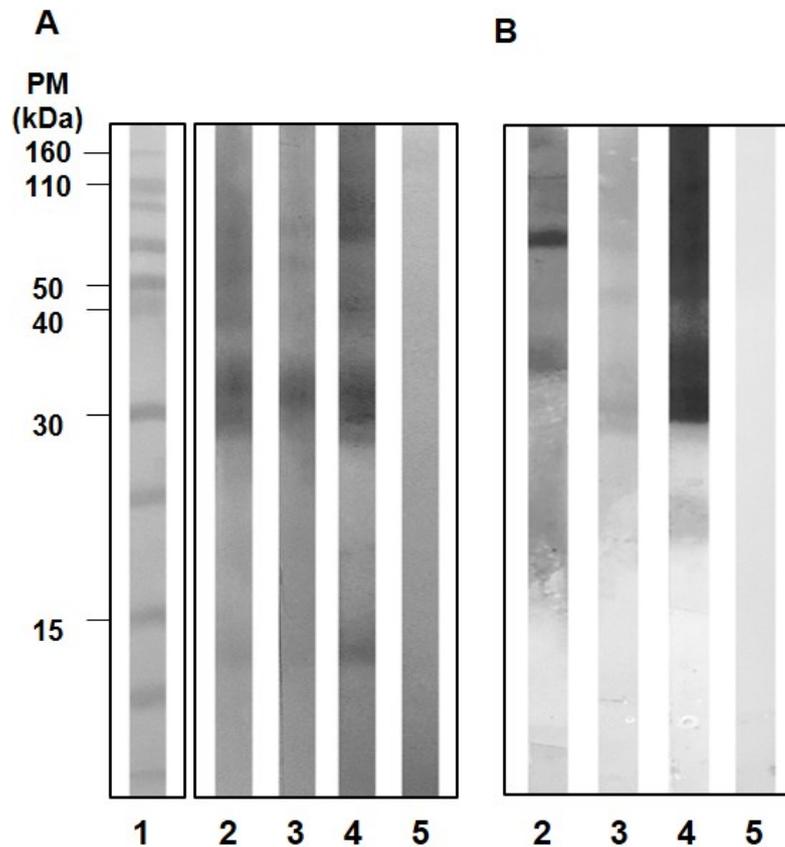


Figura 6. Reatividade de anticorpos séricos IgE por immunoblotting frente aos componentes do extrato S1 (Figura 6A) e da fração S2 (Figura 6B). Na coluna 1, padrão de peso molecular (PM) em kDa. As colunas 2-4 representam a reatividade de IgE frente aos *pools* de soros de pacientes do grupo AT; a coluna 5 representa a reatividade de IgE frente ao *pool* de soros de indivíduos do grupo NAT.

A frequência de reatividade aos anticorpos IgE em 7 pools de soros de pacientes atópicos frente ao extrato S1 e à fração S2 avaliada está representada graficamente na figura 7. A banda

de 32 kDa foi o componente com maior reatividade à IgE, tanto em S1 quanto em S2, sendo reconhecida em 100% dos *pools* de soros, seguida da banda de 69 kDa reconhecida em 86% (7/6) dos *pools* de soros. Outros componentes com amplo reconhecimento foram as bandas de 58 kDa (57% em S1 e 42% em S2), 38 kDa (71% em S1 e 57% em S2), 29 e 26 kDa (57% em S1 e 71% em S2) e 12 kDa (57% em S1 e 29% em S2). Ainda tiveram reconhecimento as bandas de 145 kDa (29% em S1 e 0% em S2), 79 kDa (14% em S1 e 14% em S2), 36 (0% em S1 e 14% em S2), e 17 kDa (14% em S1 e 14% em S2).

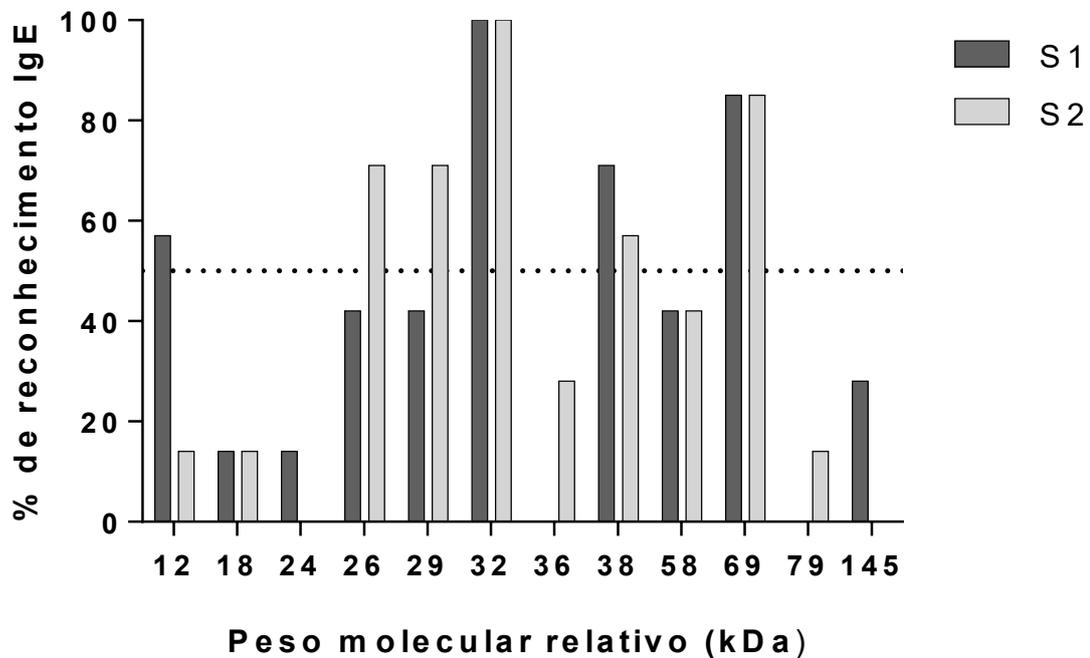


Figura 7. Frequência (%) de reatividade de cada um dos componentes do extrato total de polens *Lolium multiflorum* (S1) e da fração S2 reconhecidos pelos anticorpos da classe IgE nos soros de pacientes atópicos (n = 35, testados em 7 *pools* constituídos por 5 soros cada, analisados por *immunoblotting*). A linha tracejada indica 50% de reconhecimento.

5.8. Perfil de reatividade de anticorpos IgG4 a alérgenos do extrato S1 e da fração S2 separados por eletroforese

A fim de analisar o perfil de reatividade dos anticorpos séricos IgG4 específicos frente aos componentes do extrato S1 e da fração S2, um pool constituído por 10 soros de pacientes atópicos e um pool controle com 5 soros de indivíduos não atópicos negativos tanto para IgE quanto para IgG4 frente a S1 e S2 de acordo com o teste de Elisa foi testado por *immunoblotting*.

O ensaio revelou reatividade de IgG4 frente as bandas de 69, 58, 36, 32, 29, 26, 18-17 e 12 kDa na membrana carregada com S1. Já a membrana carregada com S2 revelou reatividade de IgG4 frente as todas as bandas obtidas com o extrato S1, exceto as bandas de 26 e 18 kDa, além de uma banda de 43 kDa, conforme mostrado na figura 8.

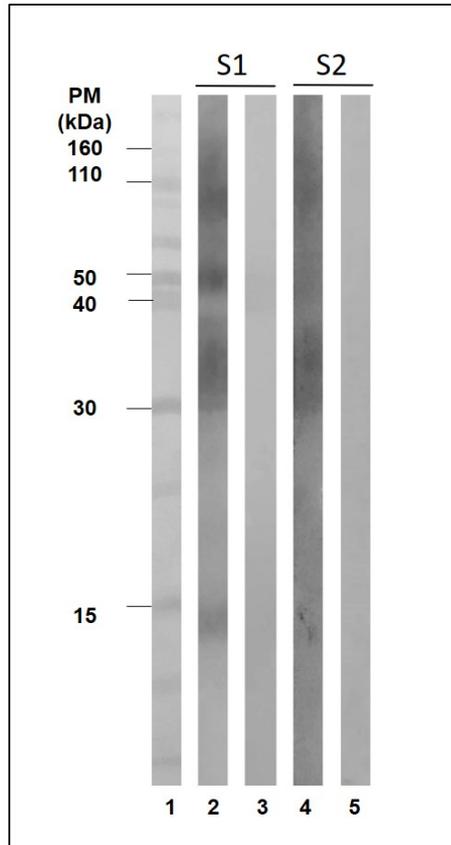


Figura 8. Reatividade de anticorpos séricos IgG4 por *immunoblotting* frente aos componentes do extrato S1 e à fração S2. Em 2 e 4, *immunoblotting*-IgG4 utilizando o extrato S1 e a fração S2, respectivamente, frente a um pool de soros do grupo AT. Em 3 e 5, um pool de soros negativos frente ao extrato total S1 e à fração S2, respectivamente. O peso molecular (PM) relativo em kDa está demonstrado na vertical à esquerda na coluna 1.

6. Discussão

Os estudos com alergia a *Lolium multiflorum* ainda são raros, ao se considerar que esta planta é uma das mais importantes fontes de alérgenos como causadora de rinite alérgica sazonal no sul do Brasil (BERNARDES et al., 2010). Desta maneira, é importante conhecer melhor a resposta imune induzida por esta gramínea, que tem ocasionado sensibilização alérgica em muitos indivíduos, levando ao desenvolvimento de condições patológicas, com a finalidade de se desenvolver ferramentas para o diagnóstico, monitoramento e tratamento específico usando extratos alérgicos derivados de *L. multiflorum*.

Neste estudo, foi buscado caracterizar os alérgenos principais desta gramínea. Os pacientes foram divididos em dois grupos, atópicos (AT) e não-atópicos (NAT) de acordo com os resultados no teste de ELISA para dosagem de anticorpos da classe IgE específicos ao extrato de polens de *L. multiflorum*. Como era esperado, a maioria dos AT apresentaram positividade no Teste Cutâneo de Puntura (TCP) frente ao extrato de *L. multiflorum*, sendo comum encontrarmos em uma minoria de pacientes atópicos valores de apresentarem TCP negativos, apesar de que a literatura afirme que a sensibilidade e especificidade do teste possa variar com o aumento da concentração do alérgeno aplicado no paciente (WAGNER; RUDERT, 2019). Uma possibilidade para este resultado seria que a concentração de antígeno aplicada para esses pacientes possa ter sido insuficiente. Porém, mais do que isto, poderíamos interpretar que esta minoria de pacientes apresentou TCP negativo, pois eles podem estar apresentando rinite ou asma não mediada por anticorpos IgE. Contudo, isto não ocorreu em nossos pacientes com TCP negativos, uma vez que mesmo nestes pacientes foi possível detectar anticorpos IgE pela técnica de ELISA. Assim, o exame sorológico teve sensibilidade superior ao TCP. Por outro lado, o extrato alérgico total de Lm empregado no teste alérgico apresentou alta especificidade desde que nenhum indivíduo do grupo NAT apresentou reatividade no TCP ou no teste ELISA para a detecção sérica de anticorpos IgE. Assim, quase todos os nossos pacientes do grupo AT apresentaram doenças alérgicas (rinite alérgica, asma e/ou conjuntivite) mediada por anticorpos IgE específicos a alérgenos de pólen de Lm.

A imunoglobulina E é conhecida hoje como o anticorpo menos abundante no plasma (100 ng/mL) tem papel fundamental na sensibilização alérgica e nos distúrbios atópicos, como a rinite alérgica, a asma e a dermatite atópica, desempenhando papel fundamental nos primeiros 60 minutos após o contato com o alérgeno. No plasma a meia vida da IgE é de cerca de 1 dia, entretanto, quando há a ligação deste anticorpo a receptores Fc-epsilon RI (alta afinidade) presentes em mastócitos, pode durar meses, o que favorece o desencadeamento da

resposta alérgica, mesmo para antígenos sazonais. Além disso, pesquisas revelam que existe uma estreita correlação entre a “sensibilização alérgica”, a produção de anticorpos IgE específicos para aeroalérgenos detectados por testes cutâneos ou medição direta de IgE e o desenvolvimento de asma em crianças de até 6 anos de idade, inferindo que a produção de IgE pode levar a doenças alérgicas em indivíduos atópicos (GODWIN; CRANE, 2019; OETTGEN, 2016; STOLTZ et al., 2013).

Em relação ao diagnóstico dos pacientes atópicos, a maioria dos pacientes apresentaram rinite e conjuntivite ou apenas rinite. A grande quantidade de pacientes com essas patologias provavelmente está associada com o bem-estar diminuído dos indivíduos adultos e crianças que relatam que a doença afeta relativamente a sua qualidade de vida com sintomas como congestão nasal, espirros, rinorréia, prurido nasal e/ou ocular, dentre outros (MELTZER, 2016; MELTZER et al., 2009). Além disso, a qualidade de sono dos indivíduos adultos alérgicos é majoritariamente afetada pela doença, sendo que um estudo demonstrou haver um excesso de micro despertares durante o sono, afetando sua qualidade e produtividade durante o dia (LAVIE et al., 1981).

Adicionalmente, tem sido demonstrada que a rinite alérgica coexiste com a asma em até 38% dos casos, aumentando a gravidade dos sintomas (CAMARGOS et al., 2002) ao contrário de nosso grupo de pacientes AT que apenas 2% apresentaram concomitantemente asma. Na maioria das vezes, em especial as doenças alérgicas respiratórias causadas por alérgenos perenes, o receio de evoluir para a asma pode ser um fato que levam os pacientes com rinite alérgica uma maior procura por centros de tratamento em busca de melhora de seu quadro clínico.

Uma parte substancial do grupo NAT foi diagnosticada com rinite, entretanto foram negativos para o TCP bem como para anticorpos IgE específicos no teste de ELISA contra *L. multiflorum*. De todos os indivíduos NAT com sintomas apenas 1 foi positivo para o TCP frente a outros extratos alergênicos testados, a saber, aos extratos de ácaros da poeira domiciliar, quais sejam, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae* e *Blomia tropicalis* (dados não mostrados), o que é uma das causas mais comuns de sensibilização aeroalérgica (ROBERTS et al., 2005; TIL-PÉREZ et al., 2019). Nesse sentido, muitas pessoas podem apresentar sintomas de rinite sem sensibilização a alérgenos e estima-se que 200 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de rinite não alérgica, ou seja, sintomas de rinite desencadeados por um mecanismo independente de IgE (BOUSQUET et al., 2008).

Dentre os tipos de rinite não-alérgica podem ser citados a rinite senil, que atinge idosos acima de 65 anos de idade, que podem apresentar diminuição da eficácia do sistema imune e aumento dos níveis de IgE total ou ainda um estado que outros autores denominam como *inflammaging*, que é um estado crônico de inflamação (HELLINGS et al., 2017; VENTURA et al., 2012). Outro tipo é a rinite gustativa, a qual tem como principal característica a rinorréia após a ingestão alimentos quentes e picantes. Estudos sugerem que os sintomas decorram de um mecanismo reflexo puramente neurogênico, no entanto um estudo mostrou maior propensão de rinite gustativa em pacientes com histórico de rinite alérgica e tabagismo (SETTIPANE, 2011; WAIBEL; CHANG, 2008).

Há ainda outros tipos de rinite, como a rinite hormonal que afeta mulheres devido a alterações hormonais no ciclo menstrual, gravidez ou menopausa, e até durante distúrbios endócrinos como hipotireoidismo, são frequentemente associados à doença. Durante a gravidez os sintomas tendem a ser mais evidentes a partir do primeiro trimestre, e ficar mais evidentes a medida que a gestação progride. Pesquisas relatam que a progesterona induz diminuição de receptores adrenérgicos $\alpha 1$ e o estrogênio leva a um aumento de receptores muscarínicos, além disso os hormônios femininos levam ao aumento da adesão de eosinófilos ao epitélio nasal. Esses resultados em conjunto podem agravar os sintomas, levando a um estado de maior infiltração de células ou mudando temporariamente a densidade dos receptores dos nervos locais (HAMANO et al., 1998; HELLINGS et al., 2017).

Além disso, ainda se destaca a rinite ocupacional, que é proveniente das partículas do ambiente de trabalho. Nesse caso diversas partículas levam a inflamação das vias aéreas superiores. Muitos dos agentes decorrentes do trabalho têm capacidade de sensibilização como grãos e polens. Para aqueles alérgenos que possuem alto peso molecular, o mecanismo de sensibilização é semelhante ao já conhecido na alergia. Os agentes de baixo peso molecular, por sua vez, não possuem capacidade imunogênica e devem antes de tudo se associar com proteínas carreadoras como albumina e queratina, formando complexo hapteno-proteína. Contudo, muitos desses agentes não induzem resposta IgE específica, como é o caso dos isocianatos, que ainda assim levam a sintomas semelhantes à rinite alérgica. Nestes casos, anticorpos da classe IgG bem como neutrófilos e eosinófilos podem ter papel na patologia da doença. Essa diferença na resposta pode estar relacionada às diferentes maneiras pelas quais os conjugados de hapteno-proteínas são processados pelas APCs. Quando os conjugados são processados de forma intracelular, são apresentados por moléculas MHC-I e reconhecidas pelas células T CD8⁺. No entanto, os complexos podem escapar do processamento endógeno, e serem

apresentados por moléculas de MHC-II em células T CD4⁺ que podem se desenvolver em uma subpopulação Th1 ou Th2, levando à produção de suas respectivas citocinas (IFN- γ pelas células Th1; IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 pelas células Th2), as quais agem em células B para induzirem mudança de isotipo de anticorpos (IFN- γ para a síntese de IgG; IL-4 e IL-13 para a síntese de IgE). Há ainda outros tipos de rinites não alérgicas que podem ser citadas como rinite induzida por drogas e rinite idiopática (HELLINGS et al., 2017; HOX et al., 2014; PARK et al., 2002).

A fim de avaliar o perfil de bandas do extrato proteico de *L. multiflorum* (S1), após a extração alergênica, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O perfil eletroforético foi semelhante ao encontrado em estudos prévios do nosso grupo (BERNARDES et al., 2010; MOREIRA et al., 2015). De todas as bandas detectadas, as bandas de 12, 32 e 58 kDa, foram as bandas com maior intensidade, com maior destaque para a banda de 32 kDa. Com base nisso a literatura sugere que as principais bandas com peso molecular relativo aproximado de 30 kDa em gramíneas são glicoproteínas com cerca de 5% de carboidratos e que tem reatividade a anticorpos da classe IgE em até 95% dos indivíduos alérgicos. Estes componentes são proteínas do grupo 1, como as β -expansinas, as quais são caracterizadas como proteases relacionadas a papaína (GROBE et al., 1999; JIN et al., 2006; PACHARN et al., 2019).

Por esta razão, buscou-se na literatura uma metodologia com capacidade de isolamento dessas β -expansinas em polens. Neste sentido, foi realizado um protocolo de extração de β -expansinas para membros da família Poaceae (LI et al., 2003) baseado na cromatografia de troca iônica. Esta técnica é amplamente utilizada para a separação de moléculas com carga diferenciada, que são concentradas durante a ligação à coluna e depois coletadas em uma forma concentrada e purificada (KOSANOVIĆ et al., 2017). Na presente análise, utilizamos crescentes concentrações de NaCl em tampão ácido para determinar a concentração ótima de eluição das amostras (dados não mostrados), que é um passo habitualmente utilizado no processo, como já realizado por diversos autores (ADAMÍKOVÁ; ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2019; LI et al., 2003). Após determinação da concentração de NaCl para o tampão de eluição, as amostras coletadas foram lidas em espectrofotômetro para determinar os valores máximos de absorvância. Semelhantemente ao extrato S1, a fração S2 também foi submetida a SDS-PAGE, para o perfil eletroforético ser avaliado, revelando que a banda de 32 kDa era nitidamente a mais intensa e que o protocolo utilizado foi eficaz para seu isolamento.

Quando foram comparados os níveis de anticorpos das classes IgE, de todos os indivíduos, frente ao extrato S1 e a fração S2, não foram observadas diferenças estatísticas, embora dois indivíduos com D.O. positivos para S1, tenham sido negativos para S2. Por isso, interpretamos que a cromatografia de troca iônica, tenha isolado os alérgenos principais de *L. multiflorum*, mas se na fração S2 continua ou não existindo componentes responsáveis por reatividades cruzadas ainda necessitam de futuras elucidações, uma vez que as nossas observações anteriores têm demonstrado que *L. multiflorum* apresenta alta reatividade cruzada com diversas outras gramíneas, tais como *Phleum pratense* e *Cynodon dactylon* (MOREIRA et al., 2015).

Para estabelecer o perfil de reatividade do extrato S1 e da fração S2 foi realizado a técnica de *Immunoblotting*. As bandas de peso molecular relativo de 12, 26, 29, 32, 39, 58 e 69 kDa foram as mais reativas nos pools de soros de indivíduos atópicos frente a S1, todas com mais de 50% de reatividade a anticorpos da classe IgE, com maior destaque para a banda de 32 kDa, que se ligou a 100% dos soros dos pacientes alérgicos, sugerindo a sua grande importância. Da mesma forma, a banda de 32 kDa, na fração S2, obteve a mesma impressionante reatividade a anticorpos da classe IgE em soros dos indivíduos alérgicos. Com destaque ainda para a reatividade da banda de 58 kDa no pool 1, e também outros componentes importantes como as bandas de 26, 29, 39 e 69 kDa, todas também com reconhecimento acima de 50% em soros dos pacientes alérgicos. Estudos prévios já demonstraram que as glicoproteínas com peso molecular variando de 25 a 37 kDa, pertencentes aos alérgenos do grupo 1 e 5 são as moléculas mais reativas envolvendo anticorpos da classe IgE em extratos de polens de gramíneas da família Poaceae como *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense* e *Poa pratensis* (MANDUZIO et al., 2012; MOREIRA et al., 2015). Portanto, podemos sustentar que a cromatografia de troca iônica foi capaz de isolar os principais alérgenos derivados de *L. multiflorum*, e que os alérgenos menores ou irrelevantes não se ligaram à coluna e, então, esses componentes sem relevância clínica estavam ausentes na fração S2. A fração isolada S2 pode ser considerada mais adequada do que S1 (extrato total), tanto para o seu emprego no diagnóstico *in vivo* (TCP), *in vitro* (IgE sérica específica) bem como para ser utilizada na imunoterapia específica com alérgenos (ITE), uma vez que a S2 foi capaz de manter a sensibilidade e especificidade no ensaio ELISA para detecção de anticorpos da classe IgE.

Não há dúvidas de que as β -expansinas são o principal grupo de alérgenos de pólen do grupo 1. Neste contexto, recentemente, Pacharn et al. (2019) identificaram duas isoformas de Cyn d 1, uma β -expansina com cerca de 29-30 kDa de *Cynodon dactylon* (grama Bermuda) por

espectrometria de massas (LC-MS/MS) como o principal alérgeno em pacientes com rinite alérgica em regiões subtropicais, e na reatividade cruzada com outras gramíneas da mesma região (PACHARN et al., 2019). Outra pesquisa realizada em coorte na Suécia, os autores também demonstraram duas β -expansinas, Phl p 1 e Cyn d 1, como os principais alérgenos sensibilizantes envolvidos na rinite alérgica em questão (STERNER et al., 2019).

O uso de extrato total de alérgenos como ácaros e polens é comumente utilizado tanto no diagnóstico quanto na ITE. Entretanto, este último é um tipo de tratamento que envolve administração prolongada por 3 a 5 anos de doses de manutenção contendo extratos alergênicos, apresentando assim risco de ocasionar diversas reações adversas. Por isso, nos últimos anos, estudos têm demonstrado que o uso de peptídeos e proteínas purificadas também tem grande eficácia, na ITE, e promovem um aumento de células T-reg FOXP3⁺ produtoras de IL-10, que são fundamentais no tratamento, pois a citocina IL-10 estimula a mudança da síntese de classe de anticorpo em células B, levando a uma maior produção de anticorpos da subclasse IgG4, os quais apresentam a função de bloquear a resposta alérgica por meio da competição com os anticorpos da classe IgE (BOONPIYATHAD et al., 2019; COX, 2017; MÖSGES et al., 2018).

Por outro lado, a ITE leva ao aumento inicial de anticorpos da classe IgE nos primeiros meses de tratamento, que tendem a diminuir ao logo do tempo (SHAMJI et al., 2017). Recentes estudos têm demonstrado que peptídeos purificados tem uma menor capacidade de ligação a anticorpos da classe IgE e menor reatividade a basófilos e mastócitos, levando a melhoria nos sintomas e reações adversas, que podem favorecer o tratamento e a sua adesão dos indivíduos alérgicos. Contudo, ainda são necessários estudos que comprovem a eficácia das proteínas purificadas na ITE (ELLIS et al., 2017; SHAMJI et al., 2018).

Como já mencionado aqui neste estudo, tem sido proposto a avaliação dos níveis de IgG4 no soro para o monitoramento da ITE como um parâmetro objetivo (TAKETOMI et al., 2017). Já é conhecido que a IgG4 compete com anticorpos IgE específicos pelos sítios de ligação dos receptores de alta afinidade a IgE (Fc ϵ RI) em mastócitos e basófilos, levando a uma diminuição da degranulação de mediadores inflamatórios, entretanto tem sido controversos os estudos de que IgG4 pode reduzir os sintomas na rinite desencadeada por polens (GEHLHAR et al., 1999; GÓMEZ et al., 2015; SHAMJI et al., 2017). Uma pesquisa revelou que o aumento nos níveis de anticorpos IgG induzidos por ITE com alérgenos modificados levam a uma redução da sensibilidade da mucosa nasal frente a alérgenos de pólen durante a estação de florescimento (REISINGER et al., 2005). Um outro trabalho recente, demonstrou que IgG4

específica induzida por ITE ao pólen, está associada à indução de anticorpos locais (nasais) e funcionais que inibem a ligação facilitada do complexo IgE-alérgeno em receptores de baixa afinidade a IgE, CD23, em células B, na mucosa nasal (SHAMJI et al., 2019). Dessa maneira, fica claro que os anticorpos IgG4 desempenham um papel regulatório importante na alergia a polens de gramíneas.

Assim, com base nos dados de IgE, decidimos testar se a fração S2 seria uma melhor candidata do que S1 para ser indicada para a imunoterapia específica com alérgenos, já que a fração S2 não possui muitos componentes sem relevância clínica comparado ao extrato total S1 de *Lm*. Para isso, avaliamos, por ELISA e *Immunoblotting*, a reatividade de anticorpos IgG4 dos soros dos pacientes AT e NAT frente ao extrato S1 e à fração S2. O teste de ELISA demonstrou que os soros contendo anticorpos IgG4 reagiram de forma semelhante tanto frente ao extrato total S1 quanto à fração S2, mostrando que ambos os extratos são eficazes na detecção de anticorpos bloqueadores específicos. Da mesma forma, o *Immunoblotting* revelou reatividade da banda de 32 kDa presentes em S1 e S2 comparável com os anticorpos IgG4, demonstrando que a fração S2 possivelmente possa ser utilizado na imunoterapia específica de pacientes alérgicos a *L. multiflorum*.

Em suma, demonstramos que a fração S2 isolada neste estudo é tão eficaz quanto o extrato total S1 na detecção de indivíduos atópicos, e que a banda de 32 kDa é o componente mais alergênico e imunogênico observada na resposta alérgica induzida por *L. multiflorum*, seguida da banda de 69 kDa e também da banda de 58 kDa, a qual pontualmente, foi bastante reativa. Os nossos dados confirmam a importância desses componentes na sensibilização por polens, demonstrando serem os alérgenos principais na indução da resposta alérgica desencadeada por polens dessa gramínea. Conforme relatado neste estudo, o uso do extrato total derivado de gramíneas deve ser substituído por outros extratos naturais, sintéticos ou recombinantes contendo predominantemente componentes imunodominantes e ao mesmo tempo serem desprovidos de componentes sem relevância clínica. Neste sentido, estudos importantes têm embasado associações de especialidades em todo o mundo para que haja recomendação de novas alternativas como estratégia terapêutica.

Desta forma, os achados deste estudo *in vitro* permitem novos avanços no diagnóstico e fornece subsídios importantes para que a fração S2 seja utilizada no tratamento de indivíduos alérgicos a *L. multiflorum* em substituição ao extrato total. Estudos adicionais com essa gramínea empregando extrato total e a fração isolada neste trabalho devem ser realizados em futuro breve, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida de pacientes com polinose,

conferindo-lhes eficácia terapêutica e concomitantemente, minimizando os efeitos adversos, incluindo novas sensibilizações alérgicas a componentes anteriormente considerados irrelevantes.

7. Conclusões

- A cromatografia de troca iônica foi eficaz no isolamento de uma fração eluída a 200 mM de NaCl (S2) contendo os principais componentes de relevância de clínica em pacientes sensibilizados a alérgenos de polens de *L. multiflorum* quando comparada com o extrato total de *L. multiflorum* (S1);
- O extrato S1 e a fração S2 foram igualmente eficazes para diferenciar indivíduos atópicos e não atópicos ao pólen de *L. multiflorum*;
- A sensibilidade e especificidade do teste ELISA na detecção de anticorpos da classe IgE específicos frente a S1 e S2 foram semelhantes;
- A banda de 32 kDa presente em ambos os extratos, S1 e S2, foi o principal componente imunodominante com reatividade a anticorpos IgE e IgG4 específicos a polens de *Lolium multiflorum*.
- A fração S2 derivada de *Lolium multiflorum*, contendo os componentes alergênicos principais clinicamente relevantes, possa ser uma candidata para ser utilizada em substituição ao extrato total (S1), tanto para diagnóstico *in vivo* (TCP) ou *in vitro* (testes sorológicos) quanto para a imunoterapia específica com alérgenos.

Referências Bibliográficas

- ADAMÍKOVÁ, J.; ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Chromatographic purification of recombinant human erythropoietin. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 4–5, p. 483–493, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02656-8>.
- AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 3, p. 621–631, 2014. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.12.1088.
- ALEKSIC, I. et al. The importance of cross-reactivity in grass pollen allergy. **Archives of Biological Sciences**, v. 66, n. 3, p. 1149–1155, 2014. DOI: 10.2298/ABS1403149A.
- ALLERGEN. Allergen Nomenclature. **International Union of Immunological Societies**. 2010. Disponível em: <<http://allergen.org/>>. Acesso em: 06/jun./19.
- ARAUJO, L. M. L.; ROSARIO, N. A.; MARI, A. Molecular-based diagnosis of respiratory allergic diseases in children from Curitiba, a city in Southern Brazil. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 44, n. 1, p. 18–22, 2016. DOI: 10.1016/j.aller.2015.03.001.
- ASAM, C. et al. Tree pollen allergens - An update from a molecular perspective. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 70, n. 10, p. 1201–1211, 2015. DOI: 10.1111/all.12696.
- BALDACARA, R. P. de C. et al. Prevalence of allergen sensitization, most important allergens and factors associated with atopy in children. **São Paulo Medical Journal**, v. 131, n. 5, p. 301–308, 2013. DOI: 10.1590/1516-3180.2013.1315502.
- BALLMER-WEBER, B. K. Value of allergy tests for the diagnosis of food allergy. **Digestive Diseases**, v. 32, n. 1–2, p. 84–88, 2014. DOI: 10.1159/000357077.
- BARNES, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 183–192, 2008. DOI: 10.1038/nri2254.
- BARTLE, J. Patient education in the effective management of hay fever. **Nursing Standard**, v. 30, n. 43, p. 48–53, 2016. DOI: 10.7748/ns.2016.e9220.
- BERINGS, M. et al. Reliable mite-specific IgE testing in nasal secretions by means of allergen microarray. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 1, p. 301–303, 2017. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.11.047.
- BERNARDES, C. T. et al. IgE cross-reactivity between *Lolium multiflorum* and commercial

grass pollen allergen extracts in Brazilian patients with pollinosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, p. 166–175, 2010. DOI: 10.1590/S0100-879X2010005000004.

BERNSTEIN, I. L.; STORMS, W. W. Practice parameters for allergy diagnostic testing. Joint Task Force on Practice Parameters for the Diagnosis and Treatment of Asthma. The American Academy of Allergy, Asthma and Immunology and the American College of Allergy, Asthma and Immunology. **Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology**, v. 75, n. 6, p. 543–625, 1995.

BONISSONI, E.; NETO, J. D. P. THE *Lolium multiflorum* ASSOCIATED WITH INCREASED CONSUMPTION OF ANTIHISTAMINES. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 1, p. 252–258, 2016. DOI: 10.5380/acd.v15i3.38495.

BOONPIYATHAD, T. et al. Der p 1-specific regulatory T-cell response during house dust mite allergen immunotherapy. **Allergy**, v. 74, n. 5, p. 976–985, 2019. DOI: 10.1111/all.13684.

BOUSQUET, J. et al. Important research questions in allergy and related diseases: Nonallergic rhinitis: A GA2LEN paper. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 63, n. 7, p. 842–853, 2008. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2008.01715.x.

BREITENEDER, H. et al. Four recombinant isoforms of Cor a I, the major allergen of hazel pollen, show different IgE-binding properties. **European Journal of Biochemistry**, v. 212, n. 2, p. 355–362, 1993. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17669.x.

BULEK, K. et al. Epithelium: the interplay between innate and Th2 immunity. **Immunology and cell biology**, United States, v. 88, n. 3, p. 257–268, 2010. DOI: 10.1038/icb.2009.113.

BURKS, A. W. et al. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 5, p. 1288–1296, 2013. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.01.049.

CAMARGOS, P. A. M. et al. Asthma and allergic rhinitis as symptoms of the same disease: a paradigm under construction. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 2, p. 123–128, 2002.

CASAGRANDE, R. R. D. et al. Prevalência de asma e fatores de risco em escolares da cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n. 3, p. 517–523, 2008. DOI: 10.1590/S0034-89102008000300018.

CASTILLO VIZUETE, J. A. et al. Asthma, rhinitis, and nasal polyp multimorbidities. **Archivos de Bronconeumologia**, v. 55, n. 3, p. 146–155, 2019. DOI: 10.1016/j.arbres.2018.09.001.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. 3–23, 2010. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.

CORTI, V. et al. Identification of grass pollen allergens by two-dimensional gel electrophoresis and serological screening. In: **Proteomics**. [s.l.]: [s.n.], 2005. DOI: 10.1002/pmic.200401038.

COX, L. S. Sublingual Immunotherapy: Historical Perspective and Practical Guidance. **The journal of allergy and clinical immunology. In practice**, v. 5, n. 1, p. 63–65, 2017. DOI: 10.1016/j.jaip.2016.11.016.

DAHL, R. et al. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2006. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.05.003.

DAVIES, J. M. et al. Molecular cloning, expression and immunological characterisation of Pas n 1, the major allergen of Bahia grass *Paspalum notatum* pollen. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 2, p. 286–293, 2008. DOI: 10.1016/j.molimm.2008.08.267.

DIVEKAR, R.; KITA, H. Recent advances in epithelium-derived cytokines (IL-33, IL-25, and thymic stromal lymphopoietin) and allergic inflammation. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, United States, v. 15, n. 1, p. 98–103, 2015. DOI: 10.1097/ACI.0000000000000133.

DREW, A. C. et al. Purification of the major group 1 allergen from bahia grass pollen, Pas n 1. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 154, n. 4, p. 295–298, 2011. DOI: 10.1159/000321821.

DURHAM, S. R.; TILL, S. J. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 102, n. 2, p. 151–164, 1998. DOI: 10.1016/S0091-6749(98)70079-X.

EIFAN, A. O.; DURHAM, S. R. Pathogenesis of rhinitis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 46, n. 9, p. 1139–1151, 2016. DOI: 10.1111/cea.12780.

ELLIS, A. K. et al. Treatment with grass allergen peptides improves symptoms of grass pollen-induced allergic rhinoconjunctivitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**,

v. 140, n. 2, p. 486–496, 2017. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.11.043.

ESTEVEZ, P. C. et al. Prevalence of perennial and seasonal allergic rhinitis with atopic sensitization to *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) and *Lolium multiflorum* (LOLIUM) in schoolchildren and adults in Curitiba. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 23, n. 6, p. 249–259, 2000.

GARCÍA-MOZO, H. Poaceae pollen as the leading aeroallergen worldwide: A review. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 72, n. 12, p. 1849–1858, 2017. DOI: 10.1111/all.13210.

GEHLHAR, K. et al. Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: The ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, n. 4, p. 497–506, 1999. DOI: 10.1046/j.1365-2222.1999.00525.x.

GEILFUS, C. M. et al. Down-regulation of ZmEXPB6 (*Zea mays*β-Expansin 6) protein is correlated with salt-mediated growth reduction in the leaves of *Z. mays* L. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 18, p. 11235–11245, 2015. DOI: 10.1074/jbc.M114.619718.

GEORAS, S. N.; REZAEI, F. Epithelial barrier function: at the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. **The Journal of allergy and clinical immunology**, United States, v. 134, n. 3, p. 509–520, 2014. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.05.049.

GODWIN, L.; CRANE, J. S. Biochemistry, Immunoglobulin E (IgE). **StatPearls**. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31082102>>. Acesso em: 03/jun./19.

GÓMEZ, E. et al. Initial immunological changes as predictors for house dust mite immunotherapy response. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 45, n. 10, p. 1542–1553, 2015. DOI: 10.1111/cea.12578.

GOSS, F. R. et al. Evaluating standard terminologies for encoding allergy information. **Journal of the American Medical Informatics Association**, v. 20, n. 5, p. 969–979, 2013. DOI: 10.1136/amiajnl-2012-000816.

GROBE, K. et al. Grass group I allergens (β-expansins) are novel, papain-related proteinases. **European Journal of Biochemistry**, v. 263, n. 1, p. 33–40, 1999. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00462.x.

HAMANO, N. et al. Expression of histamine receptors in nasal epithelial cells and endothelial cells - The effects of sex hormones. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.

115, n. 3, p. 220–227, 1998. DOI: 10.1159/000023904.

HATZLER, L. et al. Parental hay fever reinforces IgE to pollen as pre-clinical biomarker of hay fever in childhood. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 25, n. 4, p. 366–373, 2014. DOI: 10.1111/pai.12248.

HATZLER, L.; HOFMAIER, S.; PAPADOPOULOS, N. G. Allergic airway diseases in childhood - marching from epidemiology to novel concepts of prevention. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 23, n. 7, p. 616–622, 2012. DOI: 10.1111/pai.12022.

HELLINGS, P. W. et al. Non-allergic rhinitis: Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 72, p. 1657–1665, 2017. DOI: 10.1111/all.13200.

HO, I. C. C.; PAI, S. Y. Y. GATA-3—not just for Th2 cells anymore. **Cell Mol Immunol**, v. 4, n. 1, p. 15–29, 2007.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 218–230, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri2262>.

HOX, V. et al. Occupational upper airway disease: How work affects the nose. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 3, p. 282–291, 2014. DOI: 10.1111/all.12347.

HU, Y. et al. Identification of snake venom allergens by two-dimensional electrophoresis followed by immunoblotting. **Toxicon**, v. 125, p. 13–18, 2017. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.11.251.

HUGGINS, J. L.; LOONEY, R. J. Allergen immunotherapy. **American family physician**, v. 70, n. 4, p. 689–96, 2004.

JAMES, L. K.; DURHAM, S. R. Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 7, p. 1074–1088, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2008.02976.x.

JIN, Y. et al. Isolation and characterisation of two wheat beta-expansin genes expressed during male gametophyte development. **Protoplasma**, v. 228, n. 1–3, p. 13–9, 2006. DOI: 10.1007/s00709-006-0176-0.

JOHANSSON, S. G. O. et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, n. 2, p. 434–440, 2004. DOI:

10.1016/j.jaci.2003.12.591.

KAILAIVASAN, T.; DAVIES, J. M. The molecular allergology of subtropical grass pollen. **Molecular Immunology**, v. 100, p. 126–135, 2018. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.03.012.

KAKLI, H. A.; RILEY, T. D. Allergic Rhinitis. **Primary care**, v. 43, n. 3, p. 465–75, 2016. DOI: 10.1016/j.pop.2016.04.009.

KEIL, T. et al. The natural history of allergic rhinitis in childhood. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 21, n. 6, p. 962–969, 2010. DOI: 10.1111/j.1399-3038.2010.01046.x.

KOSANOVIĆ, M. et al. Ion-exchange chromatography purification of extracellular vesicles. **BioTechniques**, v. 63, n. 2, p. 65–71, 2017. DOI: 10.2144/000114575.

KOWALSKI, M. L.; JUTEL, M. Mechanisms of specific immunotherapy of allergic diseases. **Allergy**, v. 53, n. 5, p. 485–492, 1998. DOI: 10.1111/j.1398-9995.1998.tb04085.x.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970. DOI: 10.1038/227680a0.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization. **The Journal of allergy and clinical immunology**, United States, v. 134, n. 3, p. 499–507, 2014. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.06.036.

LARCHÉ, M.; AKDIS, C. A.; VALENTA, R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 761–771, 2006. DOI: 10.1038/nri1934.

LAVIE, P. et al. Breathing disorders in sleep associated with microarousals in patients with allergic rhinitis. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 92, n. 5–6, p. 529–533, 1981. DOI: 10.3109/00016488109133292.

LI, L.-C. et al. Purification and Characterization of Four -Expansins (Zea m 1 Isoforms) from Maize Pollen. **Plant physiology**, v. 132, n. 4, p. 2073–2085, 2003. DOI: 10.1104/pp.103.020024.

MALLEY, A.; REED, C. E.; LIETZE, A. Isolation of allergens from timothy pollen. **The Journal of allergy**, v. 33, p. 84–93, 1962.

MANDUZIO, H. et al. Glycoproteins are species-specific markers and major IgE reactants in grass pollens. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 2, p. 184–194, 2012. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2011.00654.x.

MAROWA, P.; DING, A.; KONG, Y. Expansins: roles in plant growth and potential

applications in crop improvement. **Plant cell reports**, v. 35, n. 5, p. 949–65, 2016. DOI: 10.1007/s00299-016-1948-4.

MASTRANDREA, F. et al. IgE responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* native major allergens Der p 1 and Der p 2 during long-term specific immunotherapy. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 52, n. 11, p. 1115–1119, 1997. DOI: 10.1111/j.1398-9995.1997.tb00185.x.

MELTZER, E. O. et al. Burden of allergic rhinitis: Results from the Pediatric Allergies in America survey. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 3, p. 43–70, 2009. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.05.013.

_____. Allergic Rhinitis. Burden of Illness, Quality of Life, Comorbidities, and Control. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 235–248, 2016. DOI: 10.1016/j.iac.2015.12.002.

MELUM, G. R. et al. A thymic stromal lymphopoietin-responsive dendritic cell subset mediates allergic responses in the upper airway mucosa. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 134, n. 3, p. 613–621, 2014. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.05.010.

MIGUERES, M. et al. Types of sensitization to aeroallergens: definitions, prevalences and impact on the diagnosis and treatment of allergic respiratory disease. **Clinical and Translational Allergy**, v. 4, n. 16, p. 16, 2014. DOI: 10.1186/2045-7022-4-16.

MIN, Y. G. The pathophysiology, diagnosis and treatment of allergic rhinitis. **Allergy, Asthma and Immunology Research**, v. 2, n. 2, p. 65–76, 2010. DOI: 10.4168/aaair.2010.2.2.65.

MOHAPATRA, S. S.; LOCKEY, R. F.; SHIRLEY, S. Immunobiology of grass pollen allergens. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 5, n. 5, p. 381–387, 2005. DOI: 10.1007/s11882-005-0011-2.

MONCHY, J. G. DE et al. Allergology in Europe, the blueprint. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 68, n. 10, p. 1211–1218, 2013. DOI: 10.1111/all.12225.

MOREIRA, P. F. de S. et al. Allergen microarray indicates Pooideae sensitization in Brazilian grass pollen allergic patients. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128402, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0128402.

MÖSGES, R. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial with

Lolium perenne peptide immunotherapy. **Allergy**, v. 73, n. 4, p. 896–904, 2018. DOI: 10.1111/all.13358.

NECKEL, J. et al. Implicações do pólen no ar: principais doenças alérgicas polínicas. **Salão do Conhecimento**, v. 1, n. 1, 2013.

OETTGEN, H. C. Fifty years later: Emerging functions of IgE antibodies in host defense, immune regulation, and allergic diseases. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 137, n. 6, p. 1631–1645, 2016. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.04.009.

OWNBY, D. R. Allergy testing: In vivo versus in vitro. **Pediatric Clinics of North America**, v. 35, n. 5, p. 995–1009, 1988. DOI: 10.1016/S0031-3955(16)36544-0.

PACHARN, P. et al. Beta-Expansin of Bermuda, Johnson, and Para grass pollens, is a major cross-reactive allergen for Allergic Rhinitis patients in subtropical climate. **Asian Pacific journal of allergy and immunology**, v. 37, n. 1, p. 30–35, 2019. DOI: 10.12932/AP-071117-0191.

PANDEY, V. Hay fever and homeopathy: A case series evaluation. **Homeopathy**, v. 105, n. 2, p. 202–208, 2016. DOI: 10.1016/j.homp.2016.01.002.

PARK, H. S. et al. Specific immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to toluene diisocyanate-human serum albumin conjugate: Useful markers for predicting long-term prognosis in toluene diisocyanate-induced asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 32, n. 4, p. 551–555, 2002. DOI: 10.1046/j.0954-7894.2002.01349.x.

PENG, Z. et al. Quantitative IgE- and IgG-subclass responses during and after long-term ragweed immunotherapy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 89, n. 2, p. 519–529, 1992. DOI: 10.1016/0091-6749(92)90318-V.

PEREIRA, E. A. L. et al. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 60, n. 3, p. 401–406, 2005. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00738.x.

POMIECINSKI, F. et al. Estamos vivendo uma epidemia de alergia alimentar? **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 30, n. 3, p. 1–3, 2017. DOI: 10.5020/18061230.2017.7080.

REISINGER, J. et al. Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 2, p. 347–354, 2005. DOI:

10.1016/j.jaci.2005.04.003.

ROBERTS, G. et al. Relationship between aeroallergen and food allergen sensitization in childhood. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 35, p. 933–940, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2005.02280.x.

ROSMILAH, M. et al. Identification of parvalbumin and two new thermolabile major allergens of thunnus tonggol using a proteomics approach. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 162, n. 4, p. 299–309, 2013. DOI: 10.1159/000354544.

SCHEI, M. A.; HESSEN, J. O.; LUND, E. House-dust mites and mattresses. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 57, n. 6, p. 538–542, 2002. DOI: 10.1034/j.1398-9995.2002.23433.x.

SERPA, F. S. et al. Prevalence rates of asthma, allergic rhinitis and atopic eczema in schoolchildren in the city of Vitória, Espírito Santo, Brazil. **Rev. Bras. Pesq. Saúde**, v. 16, p. 107–114, 2015. DOI: <https://doi.org/10.21722/rbps.v16i3.10144>.

SETTIPANE, R. A. Other Causes of Rhinitis: Mixed Rhinitis, Rhinitis Medicamentosa, Hormonal Rhinitis, Rhinitis of the Elderly, and Gustatory Rhinitis. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 31, n. 3, p. 457–467, 2011. DOI: 10.1016/j.iac.2011.05.011.

SHAMJI, M. H. et al. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 72, p. 1156–1173, 2017. DOI: 10.1111/all.13138.

SHAMJI, Mohamed H. et al. Lolium perenne peptides for treatment of grass pollen allergy: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 1, p. 448–451, 2018. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.09.013.

SHAMJI, Mohamed H. et al. Nasal allergen-neutralizing IgG 4 antibodies block IgE-mediated responses: Novel biomarker of subcutaneous grass pollen immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 3, p. 1067–1076, 2019. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.09.039.

SHAMJI, Mohamed H.; DURHAM, S. R. Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 6, p. 1485–1498, 2017. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.10.010.

SHPAKOU, A. et al. Allergic diseases and respiratory symptoms in urban and rural children

in Grodno Region (Belarus). **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 23, p. 339–346, 2012. DOI: 10.1111/j.1399-3038.2011.01263.x.

SOLÉ, D. et al. Prevalence of asthma and allergic diseases in adolescents: Nine-year follow-up study (2003-2012). **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 1, p. 30–35, 2015. DOI: 10.1016/j.jpmed.2014.05.002.

SOPELETE, M. C. et al. Sensitization to *Lolium multiflorum* grass pollen in pollinosis patients: Evaluation of allergenic fractions recognized by specific IgE antibodies. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 140, n. 2, p. 121–130, 2006. DOI: 10.1159/000092531.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. Pollen. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1974. 788 p. DOI: 10.1007/978-3-642-65905-8.

STERNER, T. et al. IgE sensitization in a cohort of adolescents in southern Sweden and its relation to allergic symptoms. **Clinical and molecular allergy : CMA**, v. 17, n. 6, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1186/s12948-019-0110-6.

STOLTZ, D. J. et al. Specific patterns of allergic sensitization in early childhood and asthma & rhinitis risk. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 43, n. 2, p. 233–241, 2013. DOI: 10.1111/cea.12050.

STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. 73–80, 2010. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.11.017.

TAKETOMI, E. A. et al. Allergen-Specific Immunotherapy Follow-Up by Measuring Allergen-Specific IgG as an Objective Parameter. **Immunotherapy - Myths, Reality, Ideas, Future**. [s.l.]: InTech, 2017. p. 382–401. DOI: 10.5772/66711.

TIL-PÉREZ, G. et al. Sensitization profile in patients with respiratory allergic diseases: differences between conventional and molecular diagnosis (a cross-sectional study). **Clinical and molecular allergy : CMA**, v. 17, n. 8, p. 1–9, 2019. DOI: 10.1186/s12948-019-0112-4.

TIMBRELL, V. L. et al. An immunodiagnostic assay for quantitation of specific ige to the major pollen allergen component, pas n 1, of the subtropical bahia grass. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 165, n. 4, p. 219–228, 2014. DOI: 10.1159/000369341.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from

- polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979. DOI: 10.1073 / pnas.76.9.4350.
- VALENTA, R. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 6, p. 446–53, 2002. DOI: 10.1038/nri824.
- VENTURA, M. T. et al. Clinical and cytologic characteristics of allergic rhinitis in elderly patients. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 108, n. 3, p. 141–144, 2012. DOI: 10.1016/j.anai.2012.01.013.
- VIEIRA, F. M.; FERREIRA, E. N.; MATTER, L. B. A prevalência de polinose está associada com a cultura de *Lolium multiflorum*? **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 28, n. 1, p. 47–52, 2005.
- WAGNER, N.; RUDERT, M. Sensitivity and specificity of standardised allergen extracts in skin prick test for diagnoses of IgE-mediated respiratory allergies. **Clinical and Translational Allergy**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019. DOI: 10.1186/s13601-019-0248-9.
- WAIBEL, K. H.; CHANG, C. Prevalence and food avoidance behaviors for gustatory rhinitis. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 100, n. 3, p. 200–205, 2008. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)60443-7.
- WANG, T. et al. The Target of β -Expansin EXPB1 in Maize Cell Walls from Binding and Solid-State NMR Studies. **Plant Physiology**, v. 172, n. 4, p. 2107–2119, 2016. DOI: 10.1104/pp.16.01311.
- YAMADA, T.; SAITO, H.; FUJIEDA, S. Present state of Japanese cedar pollinosis: The national affliction. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2014. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.11.002.
- ZIYAB, A. H. Prevalence and Risk Factors of Asthma, Rhinitis, and Eczema and Their Multimorbidity among Young Adults in Kuwait: A Cross-Sectional Study. **BioMed Research International**, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1155/2017/2184193.

Anexos

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada “Caracterização de proteínas antigênicas de aeroalérgenos reconhecidas por anticorpos das classes IgE, IgG1 e IgG4 de pacientes com doenças alérgicas”, sob a responsabilidade dos pesquisadores sob a responsabilidade dos pesquisadores, e Dr. Ernesto Taketomi da Universidade Federal de Uberlândia, Dr. Francisco de Assis Machado Vieira, Dr. Arnaldo Carlos Porto Neto da Faculdade de Medicina IMED, Dr. Nelson Augusto Rosário Filho, e Dr. Herberto Jose Chong da Universidade Federal do Paraná.

Nesta pesquisa, buscamos caracterizar novos componentes proteicos espécie-específicos com potencial alergênico e imunogênico, que poderão ser utilizados no desenvolvimento de novos testes diagnósticos por meio da detecção de anticorpos das classes IgE, IgG1 e IgG4 de pacientes alérgicos a aeroalérgenos. Serão coletados 20 mL de sangue (1 colher de sopa) de cada paciente. Nesta pesquisa cada indivíduo será distribuído em 2 grupos diferentes, a saber: I– Atópicos; II – Não- Atópicos.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pelos pesquisadores Dr. Francisco de Assis Machado Vieira, Dr. Arnaldo Carlos Porto Neto, Dr. Nelson Augusto Rosário Filho, e Dr. Herberto Jose Chong pesquisadores, que farão a coleta do sangue, os quais são médicos habilitados para tais funções. Você é livre para não doar seu material biológico.

Na sua participação, você será submetido a Teste Cutâneo de Puntura (TCP) e coleta de 20 mL de sangue para purificação do soro que será utilizado posteriormente em testes de diagnóstico de doenças alérgicas. Além disso você deverá responder ao questionário ISAC, o qual será entregue imediatamente após seu consentimento. Esse questionário poderá ser respondido no ato, ou entregue na consulta de retorno da avaliação médica.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto nem ganho financeiro por participar na pesquisa.

Os riscos são mínimos, mas podem ocasionar dor, sangramento e hematoma. Caso isso aconteça, você será imediatamente examinado por médicos assistentes e receberá tratamento adequado. Serão adotados códigos para evitar que você seja identificado. Os pacientes atópicos, serão denominados com a sigla AT, seguido uma sequência numérica. Os pacientes não-atópicos serão denominados com a sigla NAT, seguido de uma sequência numérica. Os benefícios serão a identificação dos principais componentes que causam as crises alérgicas e possíveis formas de tratamento.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem qualquer prejuízo ou coação. Até o momento da divulgação dos resultados, você também é livre para solicitar a retirada dos seus dados da pesquisa.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você.

Em caso de qualquer dúvida ou reclamação a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com:

Dr. Francisco de Assis Machado Vieira Tel.: (54) 3221-4777

Dr. Ernesto A. Taketomi

Avenida Pará, 1720 Bloco 4C, Campus Umuarama

Universidade Federal de Uberlândia

Uberlândia, MG

Tel.: (034) 3218-2195 / Telefax: (034) 3218-2333

Você poderá também entrar em contato com o CEP - Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos na Universidade Federal de Uberlândia, localizado na Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, *campus* Santa Mônica – Uberlândia/MG, 38408-100; telefone: 34-3239-4131. O CEP é um colegiado independente criado para defender os interesses dos participantes das pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir para o desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos conforme resoluções do Conselho Nacional de Saúde.

Uberlândia, de de 20.....

Assinatura do(s) pesquisador(es)

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Assinatura do participante da pesquisa

Anexo 2

Questionário ISAC- Rinite

Código: _____

Data: ____/____/____

SINTOMAS NASAIS

Como foram meus sintomas nesta semana?

1. Obstrução nasal

- 0 respiração livre
- 1 discreta dificuldade em respirar pelo nariz
- 2 moderada dificuldade em respirar pelo nariz
- 3 acentuada dificuldade em respirar pelo nariz
- 4 respiração nasal impossível

2. Prurido nasal (Coceira nasal)

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

3. Espirros

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

4. Coriza Nasal

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

SINTOMAS EXTRA-NASAIS

Como foram meus sintomas nesta semana?

5. Prurido Ocular (Coceira nos olhos)

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

6. Hiperemia Ocular (olhos vermelhos)

- 0 nenhum

- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

7. Lacrimejamento nos olhos

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

8. Prurido no ouvido (Coceira no ouvido)

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

9. Prurido no palato (Coceira no céu da boca)

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

Anexo 3**Questionário ISAC - Asma**

Código: _____ **Data:** _____

Por favor, responda as questões de 1 a 6.

Circle o número da resposta que melhor descreve como você tem estado durante os últimos sete dias.

1. Em média, durante os últimos sete dias, o quão frequentemente você acordou, por causa de sua asma, durante a noite?

- 0 nenhuma vez
- 1 uma vez
- 2 raras vezes
- 3 poucas vezes
- 4 muitas vezes
- 5 muitíssimas vezes
- 6 incapaz de dormir devido a asma

2. Em média, durante os últimos sete dias, o quão ruim foram os seus sintomas da asma quando você acordou de manhã?

- 0 sem sintomas
- 1 sintomas muito leves
- 2 sintomas leves
- 3 sintomas moderados
- 4 sintomas um tanto graves
- 5 sintomas graves
- 6 sintomas muito graves

3. Em média, durante os últimos sete dias, o quão limitado/a você esteve em suas atividades por causa de sua asma?

- 0 nada limitado/a
- 1 muito pouco limitado/a
- 2 pouco limitado/a
- 3 moderadamente limitado/a
- 4 muito limitado/a
- 5 extremamente limitado/a
- 6 totalmente limitado/a

4. Em média, durante os últimos sete dias quando de falta de ar você teve?

- 0 nenhuma
- 1 muito pouca
- 2 alguma

- 3 moderada
- 4 bastante
- 5 muita
- 6 muitíssima

5. Em média, durante os últimos sete dias, quanto tempo você teve chiado?

- 0 nunca
- 1 quase nunca
- 2 pouco tempo
- 3 algum tempo
- 4 bastante tempo
- 5 quase sempre
- 6 sempre

6. Em média, durante os últimos sete dias, quantos jatos/ inalações da bombinha de broncodilatador de curta – ação (ex.: Aerolin/Aerogold) você usou por dia? (Se você não tiver certeza em como responder esta questão, por favor, solicite auxílio)

- 0 Nenhuma
- 1 1-2 inalações na maioria dos dias
- 2 3-4 inalações na maioria dos dias
- 3 5-8 inalações na maioria dos dias
- 4 9-12 inalações na maioria dos dias

USO DE MEDICAMENTOS

Quantos dias e que, durante a última semana, você usou os seguintes medicamentos para rinoconjuntivite alérgica?

	Nunca	1xs	2xs	3xs	4xs
	0	1	2	3	4

10. Loratadina

11. Spray nasal

(Budecort/busonid)

	Nunca	1xs	2xs	3xs	4xs
	0	1	2	3	4