

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

BRUNA PONTES TESSARO

Níveis de IgE, IgG2 e IgG3 em indivíduos da região Sul do Brasil com rinite alérgica sazonal ao extrato de pólenes de *Lolium multiflorum*

Uberlândia

2023

BRUNA PONTES TESSARO

Níveis de IgE, IgG2 e IgG3 em indivíduos da região Sul do Brasil com rinite alérgica sazonal ao extrato de pólenes de *Lolium multiflorum*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas Da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Imunologia Clínica

Orientação do Prof. Dr. Rafael de Oliveira Resende

Coorientação de MSc. Laura Alves Ribeiro Oliveira

Uberlândia

2023

BRUNA PONTES TESSARO

Níveis de IgE, IgG2 e IgG3 em indivíduos da região Sul do Brasil com rinite alérgica sazonal ao extrato de pólenes de *Lolium multiflorum*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Imunologia Clínica

Uberlândia, 22 novembro de 2023.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rafael de Oliveira Resende (UFU)

Dra. Priscila Ferreira de Sousa Moreira (UFU)

Profa. Dra. Caroline Martins Mota (UFU)

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha profunda gratidão à minha família, cujo apoio e estímulo inabaláveis constituíram a base sólida que possibilitou a realização dos meus objetivos. Sua presença e amor incondicional ao longo da minha vida sempre foram fontes de força e inspiração. Este Trabalho de Conclusão de Curso é a prova tangível de que o investimento deles na minha educação valeu a pena.

Ao Professor Doutor Rafael de Oliveira Resende, agradeço pela valiosa orientação e conhecimento compartilhados ao longo deste percurso de pesquisa. Espero que nossa jornada de aprendizado continue ao longo da minha carreira acadêmica.

À minha coorientadora Laura, meu profundo agradecimento por todo o ensinamento, orientação e paciência demonstrados ao longo deste período. Suas contribuições foram inestimáveis para o sucesso deste projeto.

Aos amigos que conheci durante minha graduação, agradeço pelo apoio, incentivo e pelos momentos de lazer que tornaram esta jornada compartilhada mais significativa e agradável.

À Universidade Federal de Uberlândia, minha sincera gratidão por desempenhar um papel fundamental na realização de mais um sonho na minha trajetória acadêmica.

*“Não é na ciência que está a felicidade,
mas na aquisição da ciência”.*

- Edgar Allan Poe

RESUMO

Introdução: *Lolium multiflorum* (Lm), uma espécie de gramínea da família Poaceae, é reconhecida como a principal causa de polinose na região Sul do Brasil. A compreensão do papel das subclasses de IgG na resposta alérgica é crucial, uma vez que esses anticorpos desempenham funções distintas no sistema imunológico. No entanto, até o momento as subclasses IgG2 e IgG3 possuem mecanismos pouco conhecidos na alergia. **Objetivos:** Avaliar o perfil de resposta imune humoral de IgE, IgG2 e IgG3 em pacientes atópicos ao *L. multiflorum* diagnosticados com polinose. **Material e Métodos:** Foram coletadas amostras de soro de 27 indivíduos, que através do teste cutâneo de puntura (TCP) foram divididos em grupos de indivíduos atópicos (AT) e não atópicos (NAT). A reatividade para anticorpos específicos anti-Lm das classes IgE, IgG2 e IgG3 foi avaliada por meio de ensaios imunoenzimáticos. **Resultados:** Foi observada diferença significativa no aumento dos níveis de IgE específicos entre os indivíduos AT em comparação com NAT. Todavia não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de IgG2 bem como de IgG3 em ambos os grupos. Houve uma correlação positiva entre o teste TCP os níveis de IgE em ambos os grupos (AT e NAT), pois o tamanho da pápula se correlaciona com os níveis de IgE específicos ao *L. multiflorum* ao contrário ao observado para IgG2 e IgG3, em que não houve correlação entre TCP e níveis de IgG2 e IgG3. Os níveis de IgE anti Lm foram correlacionados com IgG3, entretanto o mesmo não foi observado para IgG2. **Conclusões:** Os resultados obtidos fornecem informações significativas sobre as respostas imunológicas desencadeadas pelos alérgenos presentes no pólen de *L. multiflorum*, contribuindo para melhor compreensão do perfil imunológico que desencadeiam sintomas associados á rinite alérgica sazonal.

Palavras - chave: Alérgeno, atopia, IgE, polinose, IgG2, IgG3

ABSTRACT

Introduction: *Lolium multiflorum* (Lm), a grass species belonging to the *Poaceae* family, is recognized as the primary cause of hay fever in the Southern region of Brazil. Understanding the role of IgG subclasses in the allergic response is crucial, as these antibodies play distinct functions in the immune system. However, up to this point, the mechanisms of IgG2 and IgG3 subclasses in allergy remain poorly understood. **Objectives:** To evaluate the humoral immune response profile of IgE, IgG2, and IgG3 in atopic patients to *L. multiflorum* diagnosed with hay fever. **Materials and Methods:** Serum samples were collected from 27 individuals, who were divided into atopic (AT) and non-atopic (NAT) groups through the skin prick test (SPT). Reactivity to specific anti-Lm antibodies of IgE, IgG2, and IgG3 classes was assessed through immunoenzymatic assays. **Results:** A significant difference was observed in the increased levels of specific IgE among AT individuals compared to NAT. However, no significant differences were observed in the levels of IgG2 and IgG3 in both groups. There was a positive correlation between the SPT and IgE levels in both groups (AT and NAT), as the size of the wheal correlated with specific IgE levels to *L. multiflorum*, unlike what was observed for IgG2 and IgG3, where there was no correlation between SPT and IgG2 and IgG3 levels. IgE levels against Lm were correlated with IgG3; however, the same was not observed for IgG2. **Conclusions:** The obtained results provide significant information about the immune responses triggered by allergens present in *L. multiflorum* pollen, contributing to a better understanding of the immunological profile that triggers symptoms associated with seasonal allergic rhinitis.

Keywords: Allergen, atopy, IgE, hay fever, IgG2, IgG3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Perfil eletroforético do extrato bruto de pólen de *L. multiflorum*, por SDS-PAGE 14%, corado por Coomassie blue.** (1) Padrão de peso molecular, em kiloDalton (kDa); (2) extrato bruto do pólen de *Lolium multiflorum*..... **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 2. Níveis séricos de anticorpos das classes IgE, IgG2 e IgG3 específicos ao extrato de pólen de *L. multiflorum*,** determinados por ELISA, em indivíduos atópicos (AT) e não-atópicos (NAT), expressos em índice ELISA (IE). **(A)** IgE anti-Lm, **(B)** IgG2 anti-Lm, **(C)** IgG3 anti-Lm. A linha tracejada indica o limiar de positividade (*cut-off* IE=1,2). Os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$. **** $p < 0,0001$ 30
- Figura 3. Níveis de correlação entre as classes de anticorpos específicos ao extrato bruto de pólen de *L. multiflorum*,** em indivíduos atópicos (AT) e não-atópicos (NAT), expressos em índice ELISA. **(A)** Correlação de IgE e IgG2 anti-Lm **(B)** Correlação de IgE e IgG3 anti-Lm, **(C)** Correlação de IgG2 e IgG3 anti-Lm. Limiares de positividade (*cut-off* IE=1,2) estão representados pelas linhas tracejadas nos eixos X e Y. Os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$ 30
- Figura 4. Correlações entre os níveis de subclasses de anticorpos específicos e teste cutâneo de puntura (TCP) ao extrato bruto de pólen de *L. multiflorum*,** em indivíduos atópicos (AT) e não-atópicos (NAT). **(A)** Correlação de IgE anti-Lm e TCP **(B)** Correlação de IgG2 anti-Lm e TCP **(C)** Correlação de IgG3 anti-Lm e TCP. Índice ELISA (IE). A linha tracejada do eixo X corresponde ao limiar de positividade do tamanho da pápula ao TCP (*cut-off*, 3 mm) e o eixo Y corresponde ao *cut-off*=1,2 (IE). Correlação de Spearman considerando significativo os valores de $p < 0,05$ 31
- Figura 5. Matriz de correlação entre TCP e os níveis de subclasses de anticorpos das classes IgE, IgG2 e IgG3 ao extrato bruto de pólen de *L. multiflorum*.** A intensidade de coloração azul indica níveis de correlação positiva e a coloração vermelha indica correlação negativa. A coloração branca indica ausência de correlação. Os números centralizados nas células representam o valor de *r* determinado pelo Teste de Correlação de Spearman. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas dos indivíduos	28
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AT	atópicos
BCA	ácido bicinconínico
BSA	soroalbumina bovina
°C	graus <i>Celsius</i>
CEP/UFU	Comitê de Ética em Pesquisa da UFU
DC	célula dendrítica
DO	densidade óptica
ELISA	ensaio imunossorvente ligado à enzima
FcεRI	receptor Fc para IgE de alta afinidade
FcγRIIb	receptor Fc para IgGs de baixa afinidade
FoxP3	<i>forkhead box P3</i>
g	grama
HCl	ácido clorídrico
IE	índice ELISA
IgE	imunoglobulina E
IgG	imunoglobulina G
IgG1	imunoglobulina G de subclasse 1
IgG2	imunoglobulina G de subclasse 2
IgG3	imunoglobulina G de subclasse 3
IgG4	imunoglobulina G de subclasse 4
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-10	interleucina 10
IL-13	interleucina 13
ILC	células linfoides inatas
ILC1	células linfoides inatas do tipo 1
ILC2	células linfoides inatas do tipo 2
ILC3	células linfoides inatas do tipo 3
ITE	imunoterapia específica com alérgenos
ITIM	motivo de inibição imunorreceptor baseado em tirosina

kDa	kiloDalton
LALIC	Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica
Lm	<i>Lolium multiflorum</i>
mAh	mili-Ampére/hora
MG	Minas Gerais
mg	miligrama
mm	milímetro
mL	mililitro
n	número de indivíduos
NAT	não atópicos
ng	nanograma
NK	<i>natural killer</i>
PBS	salina tamponada com fosfatos
PBS-T	salina tamponada com fosfatos acrescido de Tween a 0,05%
PMSF	fluoreto de fenilmetanosulfonil
PRR	receptores de reconhecimento padrão
RS	Rio Grande do Sul
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em dodecil sulfato de sódio
TGF- β	fator de crescimento tumoral do tipo Beta
Th	células T auxiliares
Th1	células T auxiliares do tipo 1
Th2	células T auxiliares do tipo 2
Th17	células T auxiliares do tipo 17
TCP	teste cutâneo de puntura
Treg	células T regulatórias
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
μ g	micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Doenças Alérgicas	12
1.2 Rinite alérgica sazonal	13
1.3 Diagnóstico de alergias	14
1.4 Mecanismos efetores da resposta imune alérgica	14
1.5 Imunoterapia específica com alérgenos	15
1.6 Mecanismo das subclasses de IgG na alergia.....	17
1.7 Pólens	18
1.8 <i>Lolium multiflorum</i> (Lm)	18
2. JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4. METODOLOGIA	23
4.1 Seleção de pacientes com rinite alérgica sazonal e indivíduos controles	23
4.2 Teste de Puntura (TCP) e coleta de sangue.....	23
4.3 Preparação do extrato alergênico de pólenes de <i>L. multiflorum</i>	23
4.4 SDS PAGE	24
4.5 ELISA para detecção de IgE específica a alérgeno de pólen de <i>L. multiflorum</i>	25
4.6 ELISA para detecção de IgG2 e IgG3 específica a alérgeno de pólen de <i>L. multiflorum</i>	25
4.7 Análise estatística	25
5 RESULTADOS	27
5.2 Caracterização demográfica e clínica dos pacientes	27
5.3 Níveis de anticorpos IgE, IgG2 e IgG3 específicos ao extrato bruto de pólenes de <i>L. multiflorum</i> em atópicos e não atópicos.....	29
5.4 Correlações entre os níveis de IgE, IgG2 e IgG3 específicos ao extrato bruto de pólenes de <i>L. multiflorum</i> em indivíduos atópicos e não-atópicos.....	30
5.5 Correlações entre o TCP e os níveis de IgE, IgG2 e IgG3 específicos ao extrato bruto de pólenes <i>L. multiflorum</i> em indivíduos atópicos e não-atópicos.	31
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	43

ANEXO B – QUESTIONÁRIO ISAC – RINITE.....	46
ANEXO C – QUESTIONÁRIO ISAC - ASMA	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Alérgicas

Em 1923, Coca e Cooke propuseram o conceito de atopia, uma terminologia que engloba um conjunto de doenças alérgicas caracterizadas por um mecanismo fisiopatológico comum. O termo "alergia" é frequentemente empregado para descrever uma resposta de hipersensibilidade do tipo 1, cujo diagnóstico é conduzido por meio do Teste Cutâneo de Puntura (TCP) utilizando extratos alergênicos com presença de imunoglobulina E (IgE) específica para alérgenos, neste caso o indivíduo é considerado atópico podendo apresentar elevação nos níveis totais de IgE sanguínea e a presença de eosinófilos (Cookson, 1999). Adicionalmente, antecedentes familiares podem servir como preditores para condições desencadeantes das doenças alérgicas (Correa *et al.*, 2023; Johansson *et al.*, 2004).

As doenças alérgicas com manifestações clínicas são asma, rinite, dermatite atópica, alergia a medicamentos, alimentos, picadas de insetos, entre outros, e podem ser consideradas um dos principais problemas de saúde na sociedade moderna onde as principais fontes de alérgenos inaláveis encontrados no ambiente incluem ácaros da poeira doméstica, do gênero *Dermatophagoides spp.*, pólenes, fungos presentes no ar e epitélio de animais (Van Ree *et al.* 1997).

Alérgenos são substâncias capazes de provocar uma resposta imunológica de ordem considerável resultante da síntese de IgE em indivíduos atópicos. O contato inicial com o alérgeno na mucosa leva à produção desta imunoglobulina, cuja resposta por ela mediada ocorre, em grande parte, no próprio local de entrada do alérgeno no organismo, como superfícies mucosas, além de linfonodos regionais (Pawankar *et al.*, 2013).

Assim, essas doenças representam um problema de saúde que resulta em respostas imunológicas incomuns à alérgenos comuns. A compreensão dessas condições e a implementação de medidas de prevenção e controle aplicadas, são essenciais para melhorar a qualidade de vida dos pacientes que sofrem com a doença. Conforme indicado por pesquisas, as enfermidades respiratórias de natureza alérgica estão emergindo como um desafio de saúde cada vez mais significativo na contemporaneidade. Estas condições afetam predominantemente crianças e adultos residentes em países desenvolvidos, embora também sejam

preponderantes em regiões em processo de desenvolvimento (Ziyab, 2017). Fatores como a diminuição da exposição a agentes microbianos durante a infância e a presença de histórico familiar de alergias são indicativos potenciais para o desenvolvimento dessas patologias. Além disso, observou-se uma prevalência mais acentuada de enfermidades alérgicas em crianças e jovens em ambientes urbanos, em comparação com seus pares em áreas rurais. Tal disparidade pode ser elucidada pela "hipótese da higiene", a qual postula que a menor exposição a micróbios conduz a respostas imunológicas hiperativas ou desreguladas (Galli *et al.*, 2008; Serpa *et al.*, 2015).

No contexto brasileiro, assim como globalmente, verifica-se um aumento nos casos de patologias alérgicas, fenômeno atribuído a múltiplos fatores, incluindo a poluição atmosférica, exposição ao tabagismo e a presença de alérgenos inaláveis, como ácaros, pólenes e fungos. Consequentemente, essas condições de saúde representam um desafio devido às respostas imunológicas atípicas a alérgenos comuns. Compreender tais condições e implementar medidas preventivas e de controle revela-se crucial para aprimorar a qualidade de vida dos pacientes que enfrentam essas enfermidades.

1.2 Rinite alérgica sazonal

A rinite alérgica, uma condição respiratória crônica, embora não classificada como grave, exerce considerável impacto na saúde pública e na qualidade de vida dos indivíduos afetados (Bousquet *et al.*, 2008). A rinite alérgica sazonal, também conhecida como polinose ou febre do feno, constitui uma condição alérgica que se manifesta anualmente durante o período de polinização, ocasionando sintomas como prurido nasal, espirros, rinorreia e congestão nasal. A sazonalidade refere-se aos sintomas que surgem no início da primavera, quando a exposição aos pólenes liberados pelas plantas atinge seu ápice. Todavia, é comum que os pacientes relatem sintomas tanto antes quanto depois desse período, devido à presença persistente de alérgenos nos ambientes domésticos. As manifestações clínicas associadas à polinose englobam rinite alérgica e conjuntivite e, em determinados casos, a asma brônquica pode estar presente. O diagnóstico é possível pela identificação dos sintomas clínicos recorrentes, aliado a testes de hipersensibilidade cutânea e à detecção de imunoglobulina E (IgE) específica para alérgenos de pólenes (Shamji *et al.*, 2017).

É imperativo ressaltar que a presença de outras alergias pode mascarar ou modificar os sintomas típicos da febre do feno. Portanto, uma análise combinada dos resultados clínicos e laboratoriais é essencial para alcançar um diagnóstico preciso. Recomenda-se a implementação de medidas preventivas e de controle da exposição a alérgenos como estratégia para mitigar os sintomas da polinose, embora essa abordagem possa ser desafiadora em muitos cenários (Shamji *et al.*, 2017).

1.3 Diagnóstico de alergias

O teste cutâneo de puntura (TCP) se constitui do método mais confiável para o diagnóstico de alergias. Esses testes são conduzidos com o intuito de identificar, de maneira direta e precisa, os alérgenos aos quais o paciente apresenta sensibilidade, sendo notáveis por sua simplicidade e rapidez. Durante a execução do teste, uma gota contendo extrato proteico, que contém componentes alergênicos, é aplicada no antebraço do paciente. Posteriormente, realiza-se uma puntura com uma lanceta para possibilitar a penetração da solução alergênica na pele. De acordo com Asher *et al.* (2011), um resultado positivo é indicado pela formação de uma pápula no local da aplicação, refletindo uma reação cutânea que evidencia a resposta alérgica ao alérgeno testado, sugerindo sua associação com os sintomas relatados.

O teste diagnóstico para quantificação da IgE específica, conduzido *in vitro*, valida o Protocolo de Investigação e Controle de Alérgenos ao quantificar os níveis de anticorpos específicos para um determinado alérgeno no soro dos pacientes. Tal abordagem contribui para a identificação dos principais elementos responsáveis pelos sintomas alérgicos. Uma alternativa diagnóstica adicional consiste no teste de provocação, em que o paciente é exposto à substância suspeita de desencadear a alergia em áreas como nariz, olhos e/ou brônquios. Este teste tem como propósito avaliar a gravidade dos sintomas manifestados nessas regiões, revelando-se útil no diagnóstico de alergias a alimentos e medicamentos. Contudo, sua aplicação ocorre predominantemente em ensaios clínicos, estudos de pesquisa, mediante o consentimento do paciente (Asher *et al.*, 2011).

1.4 Mecanismos efetores da resposta imune alérgica

Cada manifestação inicial de reação alérgica é caracterizada por um componente substancial de imunidade inata, desempenhando um papel essencial na

detecção inicial de alérgenos. Células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas, possuem receptores de reconhecimento padrão (PRR) que são instrumentalizados na detecção do componente alérgico. A ligação dos alérgenos aos PRRs pode desencadear respostas celulares como a liberação de mediadores inflamatórios e fagocitose (Halim *et al.*, 2012; Burks *et al.*, 2013). Dessa forma, as células dendríticas são capazes de capturar os alérgenos e os apresentar aos linfócitos T auxiliares (Th), desempenhando um papel central na coordenação da resposta imune adaptativa. Quando as células T auxiliares reconhecem o alérgeno, elas se polarizam para um perfil de células do tipo 2 (Th2), resultando na produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, características desse perfil. Essas citocinas estimulam os linfócitos B a diferenciarem em Plasmócitos e dessa forma a produzir IgE, que, por sua vez, se liga à superfície de mastócitos e eosinófilos, desencadeando uma inflamação crônica nas vias respiratórias (Dahl *et al.*, 2006; Durham, 1998; Valenta, 2002). Além disso, a resposta imune adaptativa engloba a formação de respostas imunológicas regulatórias, como as células T reguladoras (Treg). As Tregs desempenham uma função crucial na regulação da resposta alérgica, inibindo a atividade das células Th2 e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Akdis, 2014; Peng *et al.*, 1992; Shamji, 2017; Durham, 1998).

1.5 Imunoterapia específica com alérgenos

A imunoterapia alérgeno-específica representa uma abordagem terapêutica inovadora, consistindo na administração progressiva de alérgenos específicos, geralmente por vias subcutânea e sublingual. Esta estratégia visa modular a resposta imunológica exagerada em indivíduos alérgicos, apresentando-se como uma intervenção modificadora da doença. (Berger, 2004). Os tratamentos demonstraram eficácia na redução dos sintomas clínicos, proporcionando alívio aos pacientes alérgicos. Além disso, buscam induzir tolerância imunológica, minimizando a sensibilidade do sistema imunológico aos alérgenos e modificando o curso natural das doenças alérgicas. O aprimoramento contínuo dos protocolos de administração e a investigação de biomarcadores preditivos são essenciais para otimizar a eficácia e a aplicabilidade clínica dessa promissora abordagem terapêutica. (Shamji, 2021).

No âmbito da resposta imune inata, células linfoides inatas, células natural killer (NK), monócitos/macrófagos e células dendríticas (DCs) desempenham papéis coordenados e cruciais na regulação das respostas imunes adaptativas. Durante a resposta imune, essas células liberam componentes cruciais para a modulação da resposta imune, podendo ser reprogramadas após a exposição inicial ao alérgeno. Esta reprogramação pode ocorrer devido a uma resposta imune exacerbada (imunidade treinada) ou a uma exposição gradual, consistindo em pequenas quantidades do alérgeno, resultando em uma resposta menos intensa (tolerância treinada) devido a exposições ou desafios prévios. Essa memória imune inata emerge como um dos fatores correlacionados ao êxito da ITE e está associada a alterações na composição e no perfil de diferentes conjuntos celulares (Burks *et al.*, 2013; Huggis 2004).

Adicionalmente, as células imunes específicas conhecidas como células linfoides inatas (ILC) dividem-se em três subgrupos (ILC1, ILC2 e ILC3), desempenhando funções distintas, assemelhando-se aos subgrupos de células Th1, Th2 e Th17. As ILC1 atuam na resposta antiviral, produzindo interferon-gama. ILC2 estão envolvidas em respostas contra parasitas e alergias, produzindo citocinas como IL-4 e IL-5. ILC3 defendem contra infecções fúngicas e bacterianas, produzindo IL-17 e IL-22. Essas células ILC desempenham papéis especializados na coordenação da resposta imunológica contra diferentes tipos de patógenos. As células ILC2, em particular, desempenham um papel crucial em doenças alérgicas, com seu aumento observado após exposição a alérgenos e durante a ITE (Jaquelot, *et al.*, 2021).

No contexto terapêutico da ITE, ocorre inicialmente a produção de IgE e IgG1 específicas para o alérgeno, seguida por um incremento progressivo nos níveis de IgE e IgG alérgeno-específicas. A predominância de IgG na ITE prolongada é atribuída à produção de citocinas reguladoras, como IL-10 e TGF- β pelas células Treg, que também expressam o fator de transcrição Foxp3. Este processo culmina na indução das células e citocinas a um perfil Th2 (Akdis; Akdis, 2014; Boonpiyathad *et al.*, 2019; Peng *et al.*, 1992; Shamji; Durham, 2017).

Ao longo do curso do tratamento com imunoterapia para alergia, à medida que as doses do alérgeno são gradualmente aumentadas até atingir a dose de manutenção, os níveis de IgG específicas para o alérgeno tendem a estabilizar em um patamar. O aumento dos níveis de IgG, notadamente da subclasse IgG4, induzido pela ITE, desempenha um papel relevante na obstrução dos alérgenos, competindo com os receptores da IgE pela ligação e impedindo a ativação dos mastócitos que dependem da ligação de IgE (Akdis; Akdis, 2014; Kowalski, 1998).

A ITE configura-se como a abordagem terapêutica específica mais destacada para o tratamento das alergias, uma vez que atua sobre a causa fundamental da patologia e proporciona benefícios duradouros, mesmo após a conclusão do tratamento. Ao longo do processo terapêutico, observa-se a produção de anticorpos bloqueadores, a redução das citocinas do perfil Th2, a transição da resposta imune de Th2 para Th1 e a promoção da tolerância mediante o estabelecimento de células Treg (Dahl *et al.*, 2006; Valenta, 2002). No monitoramento dos pacientes submetidos à ITE, são conduzidas observações e medidas dos níveis séricos de IgG específica para os principais alérgenos, proporcionando um complemento ao tratamento conservador voltado para a redução dos sintomas (Taketomi *et al.*, 2017).

1.6 Mecanismo das subclasses de IgG na alergia.

A produção de IgG pode estar envolvida na indução de doenças alérgicas, principalmente na secreção de algumas subclasses. A IgG4 é capaz de impedir a ligação de IgE aos seus receptores devido a competição pelo mesmo epítipo podendo atuar de forma regulatória através de outros mecanismos. Essas imunoglobulinas podem se ligar a receptores de baixa afinidade como Fc γ R1IB (CD32B) presentes na superfície de células como monócito, macrófago, linfócitos B, mastócitos e basófilos, a ligação do anticorpo a esses receptores promove a ativação de sinais inibidores através de ITIMs (motivo de inibição imunorreceptor baseado em tirosina), essas respostas impedem a ativação de outras vias inibindo a ativação de células, produção de citocinas e degranulação de mastócitos e basófilos. Assim, mesmo na presença do complexo Fc ϵ RI, IgE e alérgeno, não ocorre degranulação de mastócitos. Dessa forma, a ativação desses receptores pode atuar como resposta regulatória em doenças alérgicas. Embora este mecanismo tenha sido amplamente descrito para IgG4, outras subclasses podem se ligar com a

mesma eficiência aos receptores Fc γ R111b. Nesse sentido, apesar de uma semelhança na ligação de IgG3, IgG1 e IgG4, sabe-se que IgG2, a segunda subclasse de IgG produzida, apresenta menor afinidade a esse receptor. Apesar disso, a ativação desses receptores por subclasses IgG3 e IgG2 não são bem descritos nas doenças alérgicas. (De Taeye, *et al.*, 2019; Vidarsson, 2014).

1.7 Pólens

Os grãos de pólen anemófilos, transportados pelo ar, exercem uma influência considerável na prevalência de alergias. Devido ao seu tamanho reduzido, esses elementos apresentam a capacidade de viajar extensas distâncias e manter-se estáveis por períodos prolongados, mesmo em ambientes com baixa umidade. Os alérgenos presentes nos grãos de pólen secos ou desidratados exibem baixa atividade na matriz citoplasmática, mas manifestam uma marcada atividade em organelas específicas, conforme evidenciado por Van Ree *et al.* (1997). Esses constituintes alergênicos do pólen, caracterizados por sua elevada solubilidade em água, encontram-se prontamente disponíveis para desencadear reações alérgicas mediadas pela IgE. Investigação demonstra que alérgenos podem ser liberados dos grãos de pólen por meio de difusão em meio isotônico ou por hidratação em meio hipotônico, impactando diferentes segmentos das vias respiratórias e induzindo sintomas alérgicos. A liberação de alérgenos do pólen é frequentemente desencadeada pelo aumento da temperatura, tempestades, chuvas intensas e poluentes, podendo ocorrer tanto nas mucosas como no ambiente externo (Van Ree *et al.*, 1997).

Nesse contexto, a polinose constitui uma condição alérgica originada pela inalação de pólenes, notadamente aqueles provenientes de gramíneas pertencentes à família *Poaceae*. Este transtorno impacta significativamente a qualidade de vida e a produtividade em diversas regiões do mundo, incluindo o Brasil (Vieira, 2021).

1.8 *Lolium multiflorum* (Lm)

O azevém italiano, conhecido por *Lolium multiflorum*, uma planta da família *Poaceae*, foi introduzido no Brasil por meio dos imigrantes europeus. Este vegetal é extensivamente empregado na pecuária, caracterizando-se pela elevada produção de grãos de pólen, consolidando-se como uma das principais fontes de alérgenos

com a capacidade de sensibilizar indivíduos em variados contextos. Na região sul do Brasil, os indivíduos sensíveis frequentemente manifestam sintomas alérgicos a partir de setembro, marcando o início da primavera, com uma diminuição progressiva desses sintomas nos meses subsequentes. Investigações recentes revelaram uma notável reatividade cruzada dos anticorpos IgE entre o pólen de *Lolium multiflorum* e outras plantas produtoras de pólen, incluindo a espécie de gramínea *Phleum pratense*. Entretanto, informações detalhadas acerca dos alérgenos específicos desta gramínea são limitadas, dificultando o diagnóstico e tratamento direcionado para indivíduos alérgicos suscetíveis a esses alérgenos (Moreira *et al.*, 2015; Sopelete *et al.*, 2006).

No sul do Brasil, especialmente no estado do Rio Grande do Sul (RS), a gramínea *L. multiflorum* destaca-se como uma planta forrageira altamente adaptada. Durante o inverno, é frequentemente utilizada entre os períodos de colheita devido à sua capacidade de proporcionar forragem e sementes abundantes. Ademais, é viável cultivar este gênero de forma isolada ou em associação com outras plantas gramíneas e leguminosas. (Pereira *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

As doenças alérgicas resultam de interações complexas entre fatores genéticos e ambientais, com a exposição aos alérgenos desempenhando um papel crucial na sensibilização. Na polinose, a quantidade e duração da exposição ao pólen estão vinculadas à sua estação de maturação. Alterações nas condições naturais, influenciadas pela atividade humana, ampliam a liberação de pólen, potencializando a sensibilização em indivíduos geneticamente predispostos e contribuindo para doenças alérgicas. Durante a primavera, ocorre um aumento notável na concentração de grãos de pólen, principalmente de gramíneas, causando sintomas sazonais como espirros e congestão nasal em pessoas alérgicas. A sazonalidade da rinite alérgica na região reflete o ciclo de vida das plantas, destacando a necessidade de compreensão desses padrões para estratégias preventivas e terapêuticas eficazes.

No Brasil, a prevalência de rinite alérgica sazonal é maior na região Sul, sendo que os indivíduos alérgicos à gramínea *L. multiflorum* são sensibilizados, resultante do aumento da concentração de grãos de pólen no ar no período de primavera na região. Essa condição é mais comum na região devido à interação entre a floração intensa da gramínea e a predisposição genética das pessoas, criando um ambiente propício para reações alérgicas sazonais.

Diante dessa associação, é de extrema importância ter conhecimento dos mecanismos desencadeadores da polinose através desta espécie pois apresenta reatividade cruzada com várias outras gramíneas pertencentes à família *Pooideae*. Atualmente, não há exames de rotina laboratoriais disponíveis para detectar anticorpos específicos para os alérgenos provenientes desse tipo de gramínea. Entretanto, torna-se possível a realização de estudos aprofundados com a intenção de avaliar indivíduos alérgicos ao *L. multiflorum* na população do Sul do país com intuito de obter uma compreensão mais abrangente da prevalência e do impacto das alergias sazonais na região, além de contribuir para a implementação de medidas preventivas e terapêuticas mais eficazes.

A compreensão do papel das subclasses de IgG na resposta alérgica é crucial, uma vez que esses anticorpos desempenham funções distintas no sistema imunológico. O presente estudo busca investigar o perfil de reconhecimento do extrato de pólen de *L. multiflorum* por meio de IgE, IgG2 e IgG3 em pacientes atópicos, sendo essas últimas pouco conhecidas na alergia. Isso traz luz ao caráter

de novidade no âmbito da imunologia clínica e os resultados poderão fornecer informações valiosas sobre o papel das subclasses de IgG na resposta alérgica e uma provável relação clínica com sintomas e níveis de IgE específicos, com um forte impacto no conhecimento científico em imunopatologia alérgica, com consequências positivas na melhora da qualidade de vida de indivíduos que sofrem com polinose por meio de novas imunoterapias direcionadas durante épocas de exposição na estação polínica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os níveis de anticorpos IgE, bem como das subclasses IgG2 e IgG3 em indivíduos atópicos (AT) e não atópicos (NAT) ao pólen de *L. multiflorum*.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter o extrato bruto do pólen da planta *L. multiflorum*;
- Avaliar o perfil eletroforético e conteúdo do extrato de pólen *L. multiflorum*.
- Determinar a sensibilização alérgica ao extrato bruto de *L. multiflorum* por teste cutâneo de puntura (TCP) em indivíduos com história clínica de alergia;
- Determinar os níveis de IgE, IgG2 e IgG3 específicos ao *L. multiflorum* por ELISA no soro de pacientes alérgicos e indivíduos controles.

4. METODOLOGIA

4.1 Seleção de pacientes com rinite alérgica sazonal e indivíduos controles

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU) sob o parecer nº 3.2.127. Todos os participantes que expressaram concordância em integrar o estudo formalizaram sua participação por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) conforme apresentado no Anexo A. O histórico clínico dos pacientes foi cuidadosamente avaliado por um médico alergista devidamente qualificado.

A pesquisa teve início em Caxias do Sul, no estado do Rio Grande do Sul, com o propósito principal de selecionar pacientes atópicos (AT) e indivíduos controle não atópicos (NAT). Quinze indivíduos (n=15) foram escolhidos com base em questionário clínico e teste cutâneo positivo (TCP) para o extrato de *L. multiflorum*. Adicionalmente, onze indivíduos (n=11) sem histórico de rinite sazonal e com TCP negativo foram selecionados no Hospital das Clínicas da UFU, localizado em Uberlândia-MG.

4.2 Teste de Puntura (TCP) e coleta de sangue

O TCP, teste cutâneo de puntura, foi realizado para analisar a hipersensibilidade imediata dos participantes. Foram utilizados extratos de alérgenos de ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae* e *Blomia tropicalis*), de epitélios de cão (*Canis familiaris*), gato (*Felis domesticus*), incluindo o extrato de *L. multiflorum*, além dos controles positivo (histamina) e negativo (solução salina) do teste. As punturas foram realizadas com lancetas apropriadas na face interna do antebraço sobre as gotas de cada extrato alergênico. A leitura do teste foi realizada após 15 minutos e um tamanho médio de pápula igual ou superior a 3 mm foi considerado positivo. Foram coletadas amostras de sangue dos participantes por punção venosa no antebraço, 10 mL de sangue de cada indivíduo. Os soros foram armazenados a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

4.3 Preparação do extrato alergênico de pólen de *L. multiflorum*

Com o intuito de obter o pólen da gramínea *L. multiflorum*, os grãos de pólen foram coletados durante a estação polínica na região rural de Caxias do Sul, no

estado do Rio Grande do Sul, e enviados ao Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica (LALIC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Aproximadamente 1g de pólen foi submetido à maceração e peneiramento (utilizando as peneiras Granutest-Telastem para Análise Ltda, conforme ABNT 35, com uma abertura de 0,50 mm/Tyler 32) para eliminar qualquer partícula contaminante. Após a maceração em nitrogênio líquido, na presença de inibidores de proteases PMSF 1,6 mM, leupeptina 100 µg/mL e aprotinina 10 µg/mL, a extração foi realizada por 18 horas a 8°C, com agitação. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10.000 x g, a 25°C por 15 minutos. O sobrenadante (extrato total) foi concentrado, dialisado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M pH 7,2 a 8°C e armazenado a -20°C. A concentração de proteína no extrato alergênico de *L. multiflorum* foi determinada por meio do método BCA (Ácido bicinconínico), utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão de referência.

A quantificação da quantidade de proteína no extrato de *L. multiflorum* foi realizada por meio do método de BCA (Sigma), empregando a albumina sérica bovina como padrão. A leitura foi realizada a um comprimento de onda de 562 nm, conforme proposto originalmente por Smith e colaboradores em 1985. O resultado obtido pela análise indicou uma concentração de 7.500 µg/mL. Posteriormente, uma diluição deste extrato (1:2) foi feita para os procedimentos subsequentes.

4.4 SDS-PAGE

Foi conduzida uma eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para a visualização das principais proteínas antigênicas presentes no extrato bruto de *L. multiflorum*. A amostra do extrato bruto de *L. multiflorum* foi solubilizada em tampão de amostra (0,1M Tris-HCl pH 6,8, % SDS, 0,2% azul de bromofenol, 20% glicerol) e incubada a 95°C por 5 minutos. Em seguida, 30 µg da amostra foram carregados em cada poço de um gel de poliacrilamida a 12% e submetidos a uma corrente de 26 mA durante o processo de eletroforese, utilizando um padrão de peso molecular multibandas proposto por Laemmli, 1970 como referência. Após a eletroforese, o gel foi corado com azul de Coomassie e posteriormente escaneado. A imagem do gel foi analisada por meio do software Image Lab para PC, Versão 6.1 (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA).

4.5 ELISA para detecção de IgE específica a alérgeno de pólen de *L. multiflorum*

Os níveis de IgE sérica específica para *L. multiflorum* foram determinados por meio de ELISA indireto. Placas de 96 poços de alta afinidade (Costar, 3590) foram sensibilizadas com o extrato alergênico a 1µg/poço. Após lavagens com PBS-Tween (PBS-T) 0,05% e bloqueio com BSA 1%,(Sigma, SLBR6769V) as amostras de soros obtidas dos indivíduos foram diluídas (1:2) e incubadas por 2h, a 37°C. Após novo ciclo de lavagens, foi adicionado o anticorpo anti-IgE biotilado e para amplificação da reação, streptavidina-peroxidase, na diluição (1:1.000), seguida da revelação com ABTS (Thermo Fisher). A densidade óptica (DO) foi determinada por um espectrofotômetro e os resultados foram expressos em índice ELISA (IE), calculados a partir da relação entre os valores de DO de cada amostra em relação aos controles negativos.

4.6 ELISA para detecção de IgG2 e IgG3 específica a alérgeno de pólen de *L. multiflorum*

Para quantificação de IgG2 e IgG3, as placas de 96 poços foram sensibilizadas com o extrato alergênico a 1µg/poço. Após lavagens com PBS-T 0,05% e bloqueio com leite desnatado 2%, as amostras de soros foram diluídas (1:5) e incubadas por 1h, a 37°C. Após novo ciclo de lavagens, foram adicionados os anticorpos anti-IgG2 e anti-IgG3 biotilado (1:1.000) em uma temperatura de 37°C e para amplificação da reação, streptavidina-peroxidase (1:1.000), seguido de revelação por ABTS (Thermo Fisher). A leitura da DO foi realizada por meio de espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram determinados por índice ELISA (IE).

4.7 Análise estatística

Todos os dados obtidos neste estudo foram analisados estatisticamente por meio do software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad, San Diego, EUA), considerando um nível de significância quando $p < 0,05$. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para avaliar diferenças entre os níveis de IgE, IgG2 e IgG3. As diferenças entre gênero, TCP e diagnóstico clínico foram avaliadas pelo teste de qui-

quadrado. As análises de correlação entre os níveis de anticorpos bem como TCP foram realizadas pelo teste de Spearman.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil eletroforético do extrato bruto de pólen de *Lolium multiflorum*

O perfil de bandas polipeptídicas de extrato bruto de pólen de *L. multiflorum* 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 bruto foram de 81, 64, 55, 48, 44, 38, 32, 29, 26, 24, 18, 17 e 12 kDa, com potencial destaque para as bandas de 55, 32 e 12 kDa, que apresentaram maior intensidade de sinal, representado na Figura 1.

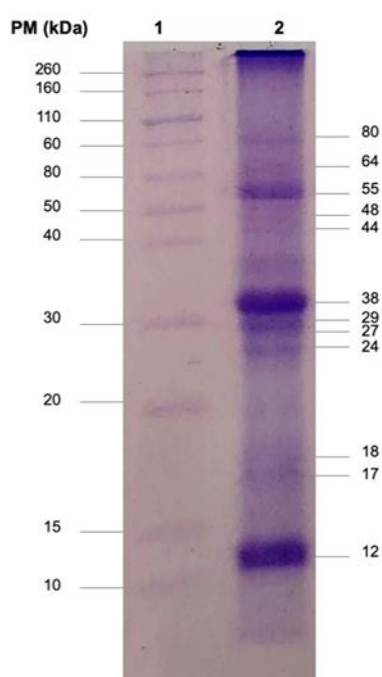


Figura 1. Perfil eletroforético do extrato bruto de pólen de Lm, por SDS-PAGE 14%, corado por Coomassie blue. (1) Padrão de peso molecular, em kiloDalton (kDa); (2) extrato bruto do pólen de *Lolium multiflorum*.

5.2 Caracterização demográfica e clínica dos pacientes

Os participantes foram categorizados em dois grupos: o grupo atópico (AT) e o grupo não atópico (NAT), com base nos resultados obtidos a partir do teste cutâneo de leitura imediata (TCP) e na avaliação clínica do médico responsável. Os indivíduos positivos ao TCP para o extrato de pólen de Lm foram incluídos no grupo AT, ao passo que os negativos ao TCP para o mesmo extrato foram inseridos no grupo NAT. As informações clínicas dos participantes recrutados para este estudo estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Características clínicas dos indivíduos.

Aspecto	Atópicos	Não atópicos	Valor de p
<i>n</i>	15 (57,7%)	11 (42,3%)	<0,0001
<i>Gênero</i>			
Masculino	5 (33,3%)	3 (27,3%)	0,5637
Feminino	10 (66,7%)	8 (72,7%)	
<i>Idade</i>			
Mediana	34	28	0,5285
<i>Pápula (mm)</i>			
média	11,2	0	<0,0001
<i>TCP</i>			
Positivo	15	0	<0,0001
Negativo	0	11	
<i>Diagnóstico clínico</i>			
Rinite	4 (26,7%)	3 (27,3%)	
Polinose	4 (26,7%)	0	
Rinite + rinite perene + polinose	3 (20%)	0	0,0008
Rinite alérgica + conjuntivite	4 (27,7%)	0	
Nenhum	0	8 (72,7%)	

Fonte: autoria própria

Neste estudo, o grupo AT correspondeu a 57,7% (n=15) do total de indivíduos (n = 26) e 42,3% (n=11) ao grupo em NAT. No grupo dos AT, 33,3% (n=5) dos indivíduos foram do sexo masculino e 66,7% (n=10) foram do sexo feminino. No grupo NAT, 27,3% (n=3) são pertencentes ao sexo masculino e, no mesmo grupo, 72,7% (n=8) foram do sexo feminino. Não houve diferença significativa entre o sexo dos indivíduos quanto a distribuição entre atópico e não atópico, representando

homogeneidade entre os gêneros nos resultados ($p=0,5637$). A média de idade para o grupo AT foi de 34 anos, enquanto o grupo NAT apresentou uma média de idade de 28 anos. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à idade ($p=0,5285$).

No grupo NAT, 27,3% ($n=3$) dos indivíduos responderam possuir sintomas de rinite alérgica e 72,7% ($n=8$) relataram o oposto e, no grupo AT, 26,7% ($n=4$) foram diagnosticados com rinite alérgica e polinose, 20% ($n=3$) apresentaram rinite + rinite perene + polinose e 27,7% relataram rinite alérgica + conjuntivite.

5.3 Níveis de anticorpos IgE, IgG2 e IgG3 específicos ao extrato bruto de pólenes de *L. multiflorum* em atópicos e não atópicos

Para avaliar os níveis de anticorpos IgE, IgG2 e IgG3 específicos ao Lm, foi realizado o ensaio imunoenzimático ELISA utilizando o soro dos dois grupos: AT ($n=15$) e NAT ($n=11$).

Os resultados demonstram que os níveis de anticorpos da classe IgE específicos para o extrato bruto de *L. multiflorum* foram significativamente maiores nos soros do grupo AT (mediana IE=6,5) ($p<0,0001$) em comparação com os soros dos pacientes não atópicos (mediana IE=0,71) (**Figura 2A**). Todos os indivíduos NAT apresentaram níveis de anticorpos IgE abaixo do limite de positividade (IE=1,2).

Em relação aos níveis de IgG2 específicos ao Lm não foi observada diferença significativa entre os grupos AT e NAT ($p=0,2774$) (**Figura 2B**), de forma semelhante a IgG3 ($p=0,0712$).

Com relação aos resultados apresentados, podemos observar que apesar do grupo AT possuir diferença significativa nos níveis de IgE em relação ao NAT, no mesmo não foi observado com as subclasses IgG2 e IgG3, pois ambos produzem na mesma quantidade.

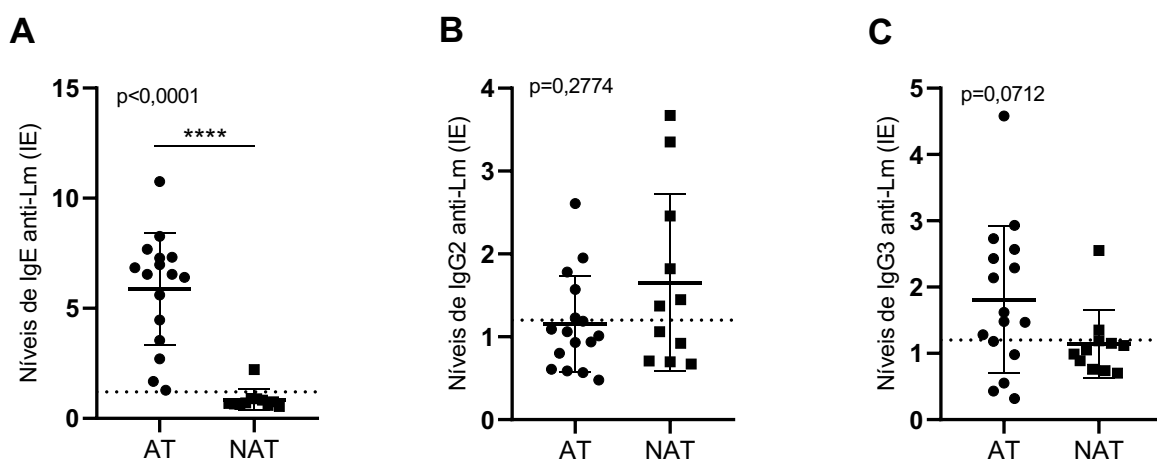
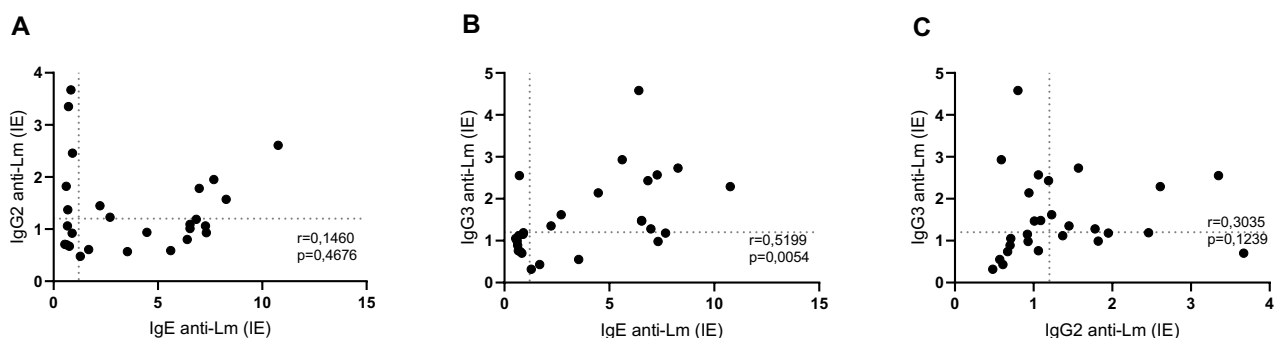


Figura 1. Níveis séricos de anticorpos das classes IgE, IgG2 e IgG3 específicos ao extrato de pólenes de *Lolium multiflorum*, determinados por ELISA, em indivíduos atópicos (AT) e não-atópicos (NAT), expressos em índice ELISA (IE). (A) IgE anti-Lm, (B) IgG2 anti-Lm, (C) IgG3 anti-Lm. A linha tracejada indica o limiar de positividade (*cut-off* IE=1,2). Os valores de p foram considerados significativos quando $< 0,05$. ** $p < 0,0001$.**

5.4 Correlações entre os níveis de IgE, IgG2 e IgG3 específicos ao extrato bruto de pólenes de *L. multiflorum* em indivíduos atópicos e não-atópicos.

A fim de correlacionar os níveis de IgE, IgG2 e IgG3 em indivíduos AT e NAT foi realizado o teste de correlação de Spearman, representados graficamente e na matriz de correlação (**Figura 3, 4 e**). Não houve correlação entre os níveis destes anticorpos ($r=0,1460$, $p=0,4676$) (**Figura 1A**), ao contrário do comparativo entre IgE e IgG3, com uma positiva correlação entre ambas as variáveis ($r=0,5199$; $p=0,0054$) (**Figura 3B**). Por outro lado, não foi observada correlação entre os níveis de IgG2 e IgG3 específicos ao Lm nos grupos AT e NAT ($r=0,3035$; $p=0,1239$) (**Figura 3C**).

Pode se observar que indivíduos que apresentam IgE específica para o Lm podem apresentar concomitantemente níveis elevados de imunoglobulina IgG3, mas tal correlação não é observada no caso da imunoglobulina IgG2.



pólenes de *L. multiflorum*, em indivíduos atópicos (AT) e não-atópicos (NAT), expressos em índice ELISA. (A) Correlação de IgE e IgG2 anti-Lm (B) Correlação de IgE e IgG3 anti-Lm, (C) Correlação de IgG2 e IgG3 anti-Lm. Limiares de positividade (*cut-off* IE=1,2) estão representados pelas linhas tracejadas nos eixos X e Y. Os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5.5 Correlações entre o TCP e os níveis de IgE, IgG2 e IgG3 específicos ao extrato bruto de pólen *L. multiflorum* em indivíduos atópicos e não-atópicos.

Para avaliar correlação entre o TCP e os níveis de anticorpos específicos ao extrato de Lm (IgE, IgG2 e IgG3) foi realizado o teste de correlação de Spearman e os resultados foram demonstrados por meio de uma matriz de correlação. Apesar dos níveis de IgE e TCP serem estreitamente correlacionados, o mesmo não é observado com relação as subclasses, sendo que o teste cutâneo de puntura pode não interferir nos níveis de anticorpos da classe de IgG. Foi observada forte correlação entre o tamanho da pápula e os níveis de IgE específica. ($r=0,6517$, $p=0,0003$) (**Figura 4A**), ao contrário de IgG2 ($r=0,2344$, $p=0,2491$) (**Figura 4B**) e IgG3 ($r=0,4142$, $p=0,0368$) (**Figura 4C**).

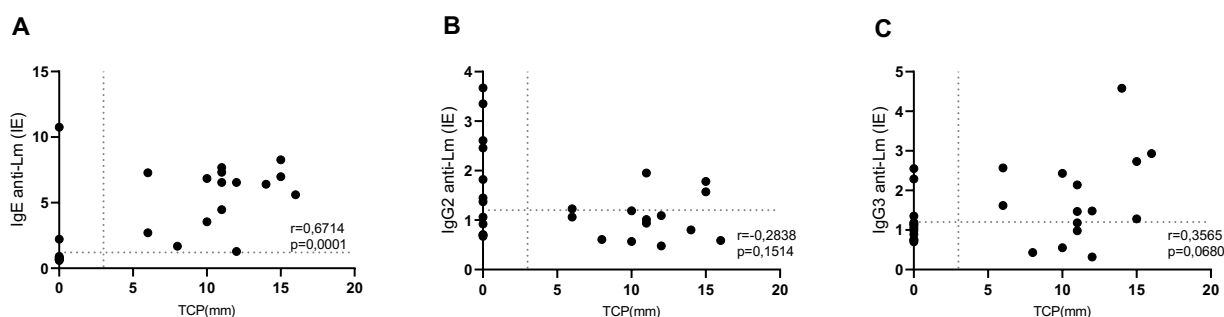


Figura 3. Correlações entre o TCP os níveis de subclasses de anticorpos específicos e teste cutâneo de puntura (TCP) ao extrato bruto de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm), em indivíduos atópicos (AT) e não-atópicos (NAT). (A) Correlação de IgE anti-Lm e TCP (B) Correlação de IgG2 anti-Lm e TCP (C) Correlação de IgG3 anti-Lm e TCP. Índice ELISA (IE). A linha tracejada do eixo X corresponde ao limiar de positividade do tamanho da pápula ao TCP (*cut-off*, 3 mm) e o eixo Y corresponde ao *cut-off*=1,2 (IE). Correlação de Spearman considerando significativo os valores de $p<0,05$.

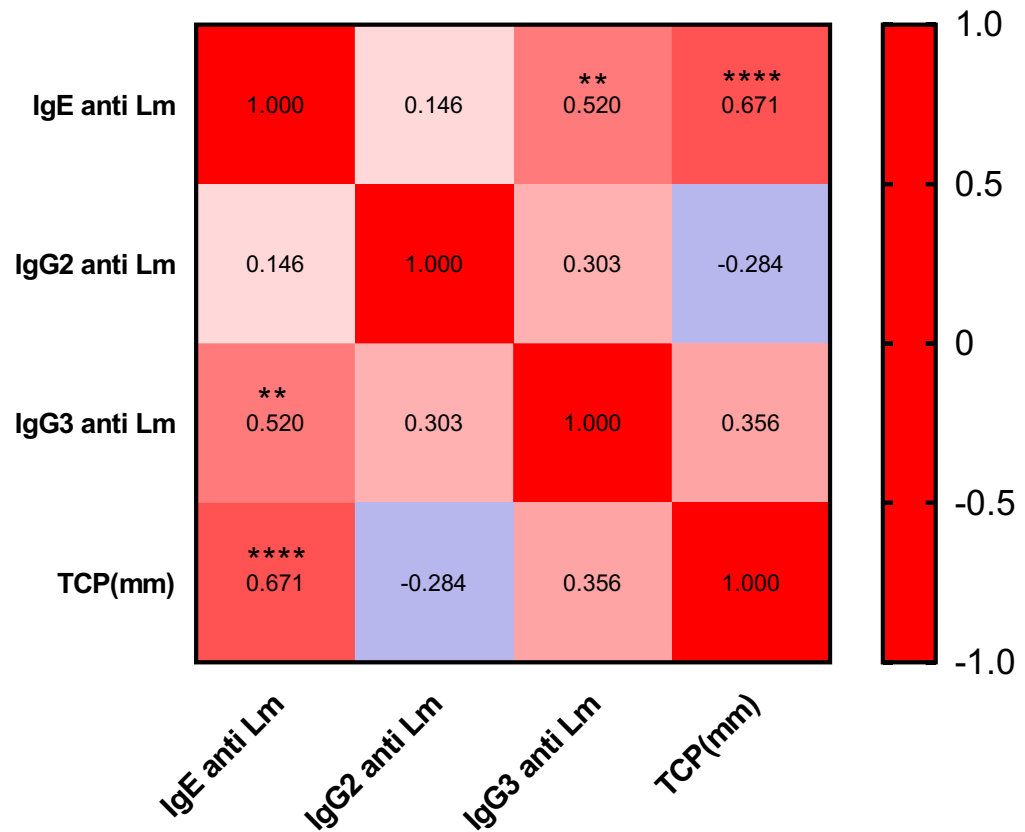


Figura 4. Matriz de correlação entre TCP e os níveis de subclasses de anticorpos das classes IgE, IgG2 e IgG3 ao extrato bruto de pólen de *L. multiflorum*. A intensidade de coloração vermelha indica níveis de correlação positiva e a coloração azul indica correlação negativa. A coloração branca indica ausência de correlação. Os números centralizados nas células representam o valor de r determinado pelo Teste de Correlação de Spearman. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$.**

6. DISCUSSÃO

Este estudo focaliza na atopia induzida pelo pólen da gramínea *L. multiflorum*, também conhecida como azevém, que desempenha um papel importante como fonte de alérgenos responsáveis pela rinite alérgica sazonal no sul do Brasil (Bernardes *et al.*, 2010). O objetivo desta pesquisa é aprofundar a compreensão da resposta imune humoral desencadeada por esse fator, que tem sido responsável pela sensibilização alérgica em muitos indivíduos, resultando em condições adversas de saúde. A caracterização dos principais alérgenos presentes no extrato bruto dessa gramínea e a análise de como se comportam em relação às subclasses específicas de anticorpos em diferentes grupos de pacientes, atópicos e não atópicos, poderão suportar conceitos teóricos sobre o mecanismo de desenvolvimento da atopia. Essas informações possibilitarão a criação de ferramentas para o diagnóstico, monitoramento e tratamento específico, incluindo imunoterapias que utilizam extratos alergênicos derivados de pólen de *Lolium multiflorum*, conforme destacado por Vidarsson (2014).

Nesta abordagem, os pacientes atópicos (AT) apresentaram sinais de rinite e polinose, acompanhados de níveis elevados de IgE específica para o extrato de pólen da gramínea *L. multiflorum*. Esses quadros têm um impacto significativo na qualidade de vida dessas pessoas, uma vez que podem causar sintomas como congestão nasal, espirros e coriza. Por outro lado, como esperado, o grupo de pessoas não atópicas (NAT) não demonstrou níveis significativos de IgE e não apresentou sintomas de rinite alérgica.

É massiva a quantidade de trabalhos que destacam a importância da IgE na sensibilização alérgica e em distúrbios como rinite alérgica e asma que se manifestam logo após o contato com alérgenos específicos, intensificando a gravidade dos sintomas (Soares *et al.*, 2007). A maioria dos pacientes com polinose submetidos ao teste cutâneo de puntura apresentou reações positivas ao extrato de *L. multiflorum* como resultante de níveis elevados de anticorpos IgE específicos para esse componente, devidamente confirmados por ELISA. Vale ressaltar que, em alguns pacientes atópicos, os resultados do teste cutâneo de leitura imediata foram negativos, o que pode ser atribuído a variações na sensibilidade e especificidade do teste, dependendo da concentração do extrato alergênico utilizado (Godinho *et al.*, 2003).

Apenas um indivíduo em particular foi classificado no grupo AT devido ao teste de ELISA IgE específico ao pólen de *L. multiflorum* resultar negativo e testou positividade no TCP. Essa discrepância nos resultados sugere a avaliação de uma análise aprofundada que possivelmente podem ser atribuídas à composição do extrato de pólenes de Lm, que contém proteases, como descrito recentemente por Corrêa *et al.* (2023), que por sua vez podem ativar basófilos e mastócitos via receptor específico de proteases (Carvalho *et al.*, 2009; Siiskonen; Harvima *et al.*, 2019). Notoriamente, a IgE é um anticorpo presente em quantidades bastante reduzidas no plasma sanguíneo, geralmente em torno de 100 ng/mL, contudo, desempenha um papel crucial na alergia e em condições atópicas, como rinite alérgica, asma e dermatite atópica (Zhang, 2021). Este anticorpo é particularmente relevante nos primeiros 60 minutos após o contato com alérgenos. Embora sua meia-vida no sangue seja curta, em torno de um dia, quando se liga aos receptores de alta afinidade FcεRI em células como mastócitos, sua ação pode durar meses, o que pode desencadear respostas alérgicas, mesmo para alérgenos sazonais. Pesquisas também sugerem que a produção de anticorpos IgE específicos para alérgenos aéreos, detectada por meio de testes cutâneos ou medição direta de IgE, está intimamente relacionada ao desenvolvimento de asma em crianças até os seis anos de idade (Nelson, 2014). Isso sugere que a produção de IgE pode levar ao desenvolvimento de doenças alérgicas em indivíduos atópicos.

Para visualização do conteúdo proteico no extrato de pólen de *L. multiflorum*, foi realizada uma análise do perfil eletroforético das bandas do extrato bruto após a extração alergênica, identificando bandas de proteínas com diferentes pesos moleculares. Parte dessas proteínas podem ser glicosiladas, com forte atividade antigênica a anticorpos IgE em indivíduos atópicos, desempenhando um papel crucial nas respostas alérgicas (Correa *et al.*, 2023). Apesar de potencialmente detectadas, não foi possível avaliar a reatividade de anticorpos IgE bem como as subclasses de IgG frente a cada uma das bandas polipeptídicas. Desta forma, estudos adicionais poderão apontar para um possível perfil de reatividade alergênica do extrato do pólen de *L. multiflorum*.

Ao realizar a análise dos níveis de IgG2 específicos ao *L. multiflorum* não houve uma diferença significativa entre os grupos AT e NAT. Alguns trabalhos apontam que IgG2 está mais associada à resposta imune contra antígenos bacterianos e polissacarídeos e indivíduos com deficiência na produção dessa

subclasse são susceptíveis a tais infecções. Além disso, por apresentar baixa afinidade com receptores $Fc\gamma$, a IgG2 não ativa complemento de forma eficaz, comportamento semelhante à IgG4, que durante imunoterapias alergênicas pode ser potencializada (Napodano *et al.*, 2021). Apesar de IgG4 não estar visível aos objetivos deste estudo, pois já foi encontrado aumento dessa subclasse em indivíduos atópicos à polens de *L. multiflorum* em outro estudo de Correa e colaboradores (2023), aqui foi demonstrado uma ausência de correlação entre IgE e IgG2 bem como as subclasses entre si. A IgE, associada principalmente a respostas alérgicas, e a IgG2, uma das subclasses da Imunoglobulina G envolvida na resposta imunológica a infecções, não apresentaram uma relação direta no contexto do estudo. Além disso, as subclasses de IgG entre si também não demonstraram correlação significativa. Vale ressaltar que a IgG4 não foi considerada nos objetivos do estudo. Esses resultados indicam a complexidade das interações entre as classes e subclasses de anticorpos em resposta a diferentes estímulos imunológicos, proporcionando insights valiosos para compreender as dinâmicas específicas do sistema imunológico em avaliação.

Em relação à subclasse IgG3, observou-se uma tendência de aumento no grupo AT em comparação ao NAT, apesar de estatisticamente irrelevante. Estudos relatam que IgG3 representa apenas 8% do total de IgG e que, quando não se ligam a receptores, possuem meia-vida de apenas 7 dias, apesar de fortemente envolvida em funções pró-inflamatórias, devido à capacidade de ativação do sistema complemento, o que pode explicar a correlação positiva entre os níveis de IgG3 e IgE em indivíduos AT, com aumentos unidirecionais em alguns indivíduos. Visto que esta imunoglobulina se liga com alta afinidade ao receptor inibitório $Fc\gamma RIIb$, competindo com IgE, pode-se considerar que a exposição recente ao Lm constitui em aumento na produção de IgG3 e sua ligação aos receptores inibitórios, resultando em diminuição dos sintomas da polinose (Napodano, *et al.*, 2021). Outro estudo relata essa capacidade da IgG em realizar influência na ligação do complexo alérgeno-IgE, podendo, potencialmente, inibir sua secreção formando complexos alérgenos e IgG que ativam o receptor inibitório ($Fc\gamma RIIb$) em basófilos e mastócitos, regulando a reação induzida por alérgenos (Veri *et al.*, 1997).

Ao analisar as correlações entre as subclasses de anticorpos IgG2 e IgE em indivíduos expostos ao pólen da gramínea *L. multiflorum*, observamos que não

houve uma correlação significativa entre essas duas variáveis. Esses resultados indicam que a IgG2 apesar de ser a segunda subclasse de IgG abundante no soro e a meia-vida circulante ser de 22 dias, ligando-se com baixa afinidade ao receptor de inibição (Fc γ R11b), é possível que suas funções não se assemelhem à IgG4 na geração de respostas regulatórias no contexto da inflamação alérgica, visto que na imunoterapia o aumento de IgG4 é dominante e essencial na manutenção da resposta imune (Movévare *et al.*, 2017). Para avaliar o papel da IgG2 na sua relação com IgG4, outras abordagens serão necessárias focalizando no recrutamento de indivíduos em tratamento de imunoterapia, o que não foi possível em nosso estudo. Ainda, no contexto de IgG2 e IgG3, estudos relataram parâmetros que determinam a eficácia do receptor Fc γ 11b expresso em basófilos humanos com função de inibição da resposta imune. Neste contexto, a subclasse de IgG1 apresenta pouca interação funcional com o receptor, ao contrário das subclasses IgG2 e IgG3, que possuem forte interação inibitória de secreção de componentes inflamatórios mediada por IgE, apesar de IgG3 realizar tal função com eficácia até dez vezes maior em comparação com IgG2 (Macglashan; Hamilton, 2016).

A correlação significativa entre os níveis de IgE e os resultados do TCP em resposta à exposição ao alérgeno *L. multiflorum* é um importante achado deste estudo e que outros estudos estudo como Correa e colaboradores (2023) demonstram correlações entre 85-95% entre níveis de IgE. Entretanto a sensibilidade aos alérgenos relevantes devem ser interpretados com atenção, considerando o histórico clínico do indivíduo alérgico (Fрати *et al.*, 2018). Essa relação entre os dois testes, deve ser usada para diagnosticar a sensibilidade a alérgenos específicos e auxiliar no tratamento de condições alérgicas, como a rinite alérgica e polinose.

Nenhuma correlação entre as subclasses de anticorpos IgG2 e IgG3 em relação ao TCP foi evidenciada, esses resultados sugerem que essas subclasses de anticorpos não possuem papel direto evidente nas respostas alérgicas locais. Entretanto, esses anticorpos podem se ligar aos receptores Fc γ R11b em basófilos e mastócitos. Esse receptor possui atividade inibitória quando ativado através da ligação com IgG4, o que compromete a degranulação dessas células (Chirumbolo, 2016). Contudo, embora as subclasses IgG2 e IgG3 tenham essa mesma

capacidade, possivelmente sua atuação em processos alérgicos não seja tão significativa quanto à IgG4.

As limitações deste estudo denotam a necessidade de execução de estratégias adicionais no sentido de avaliar o conteúdo proteico de Lm e o mecanismo de resposta imune humoral envolvendo as diferentes subclasses de IgG na inibição da ativação de células da resposta imune inata e sua relação com a IgE específica a alérgenos desta espécie vegetal.

7. CONCLUSÃO

- Os níveis de IgE específica estão diretamente correlacionados ao diâmetro da pápula em indivíduos que sofrem de polinose, diferentemente dos níveis de IgG2 e IgG3.
- Pacientes atópicos apresentam rinite e polinose com níveis significativos de IgE específica ao pólen de Lm, afetando significativamente sua qualidade de vida devido aos sintomas alérgicos.
- A maioria dos pacientes atópicos apresentou positividade ao extrato de pólen de Lm no teste cutâneo de punção, mas houve discrepâncias em alguns casos.
- Não foi observada correlação entre as subclasses de anticorpos IgG2 e IgG3 em relação ao teste cutâneo de punção. No entanto, sugere-se que a quantidade dessas subclasses de anticorpos pode estar relacionada à ligação aos receptores FcγIIIb em basófilos e mastócitos, afetando a reatividade alérgica.
- Não foi observada uma diferença significativa nos níveis de IgG2 entre os grupos AT e NAT. Isso sugere que a IgG2 pode não desempenhar um papel semelhante à IgG4 na regulação da inflamação alérgica, que é dominante na imunoterapia alérgica.
- Houve uma tendência de aumento nos níveis de IgG3 no grupo AT em comparação com o grupo NAT, embora não tenha sido estatisticamente significativo.
- As proteínas de 12, 32 e 55 kDa exibem uma maior abundância no extrato de Lm.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ASHER, M. I., *et al.* The Isaac story: the international study of asthma and allergies in childhood. **International Study of Asthma and Allergies in Childhood**, v. 43, n. 9, p. 238-234, 2011.
- BERGER, W. E. Allergic rhinitis in children: diagnosis and management strategies. **Pediatric Drugs**, v. 6, n. 4. p.233-250, 2004.
- BERNARDES, C. T. *et al.* IgE cross-reactivity between *Lolium multiflorum* and commercial 59 grass pollen allergen extracts in Brazilian patients with pollinosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 2, p. 166–175, 2010.
- BOHANNON, M.; LIU, M.; NADEAU, P.; TALTON, J. *et al.* Topical doxycycline monohydrate hydrogel 1% targeting proteases/PAR2 pathway is a novel therapeutic for atopic dermatitis. **Experimental Dermatology**, v. 29, n. 12, p. 1171-1175, 2020.
- 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.
- BOUSQUET, J. *et al.* Important research questions in allergy and related diseases: nonallergic rhinitis: A GA2LEN paper. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 63, n. 7, p. 842–853, 2008.
- 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.
- CARVALHO, R. F. S.; NILSSON, G.; HARVIMA, I. T. Increased mast cell expression of PAR-2 in skin inflammatory diseases and release of IL-8 upon PAR-2 activation. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 2, p. 117–122, 2009.
- CHIRUMBOLO, S. Basophil activation test, skin prick test, and anaphylaxis after drug hypersensitivity. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 116, n. 5, p. 478, 2016.
- COCA A. F; COOKE, R. A. On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. **Journal of Immunology**, v. 3, n. 8, p. 163-182, 1923.
- CORREA, A. S. 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. 2019. 76 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Clínica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

- CORREA, A. S. *et al.* Identification of carboxymethyl (CM)-binding proteins derived from *Lolium multiflorum* pollen extract and antibody reactivity in Brazilian allergic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 56, s. n., p. e12957, 2023.
- COOKSON, J. A.; RAWLEY, E. Z. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **Nature**, v. 402, n. S6760, p. 5-11, 1999.
- DAHL, R. *et al.* Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, n. 2, p. 434-440, 2006.
- DE TAEYE, S. W.; RISPENS, T.; VIDARSSON, G. The ligands for human IgG and their effector functions. **Antibodies**, v. 8, n. 2, p. 30, 2019.
- 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.
- FRATI, F. *et al.* The skin prick test. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 32, n. 1 Suppl. 1, p. 19-24, 2018.
- GALLI, S. J., TSAI, M, POLIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation; **Nature**, v. 4, n. 54, p. 445-454, 2018.
- GODINHO, R. *et al.* Frequência de positividade em teste cutâneo para aeroalérgenos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n.6, p. 824-828, 2003.
- HALIM, T. Y, KRAUSS, R. H, SUN, F. Lung natural auxiliary cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 451-463, 2012.
- HUGGINS, J. L.; LOONEY, R. J. Allergen immunotherapy. **American Family Physician**, v. 70, n. 4, p. 689–696, 2004.
- JACQUELOT, N. *et al.* Blockade of the co-inhibitory molecule PD-1 unleashes ILC2-dependent antitumor immunity in melanoma. **Nature immunology**, v. 22, n. 7, p. 851-864, 2021.
- JOHANSSON, S. C. O., *et al.* Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 4, p. 832-836, 2fach004.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- KOWALSKI, M. L.; JUTEL, M. Mechanisms of specific immunotherapy of allergic diseases. **Allergy**, v. 53, n. 5, p. 485–492, 1998.

- MACGLASHAN, D., Jr.; HAMILTON, R. G. Parameters determining the efficacy of CD32 to inhibit activation of FcεRI in human basophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 4, p. 1256-1258.e1211, 2016.
- MOREIRA, P. F. S. *et al.* Allergen microarray indicates Pooideae sensitization in Brazilian grass pollen allergic patients. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128402, 2015.
- MOVÉRARE, R. *et al.* Human allergen-specific IgG subclass antibodies measured using ImmunoCAP technology. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 172, n. 1, p. 1–10, 2017.
- NAPODANO, C. *et al.* Immunological Role of IgG Subclasses. **Immunological Investigations**, v. 50, n. 4, p. 427-444, 2021.
- NELSON H. S. Subcutaneous immunotherapy versus sublingual immunotherapy: which is more effective? **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 2, n. 2, p.144–149, 2014
- PAWANKAR, R, *et al.* WAO Allergy White Paper: 2013 updated executive summary Milwaukee: **World Allergy Organization**, v. 2, n. 1, p. 545-546, 2013.
- PENG, Z. *et al.* Quantitative IgE- and IgG-subclass responses during and after long-term ragweed immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 89, n. 2, p. 519–529, 1992.
- 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, 2008.
- SERPA, F. S. *et al.* Prevalence rates of asthma, allergic rhinitis and atopic eczema in schoolchildren in the city of Vitória, Espírito Santo, Brazil. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 16, n.3, p. 107–114, 2015.
- SIISKONEN, H.; HARVIMA, I. Mast cells and sensory nerves contribute to neurogenic inflammation and pruritus in chronic skin inflammation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, s. n., p. 1–11, 2019.
- SHAMJI, M. 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.
- SHAMJI, M. H. *et al.* Differential induction of allergen-specific IgA responses following timothy grass subcutaneous and sublingual immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 148, n. 4, p. 1061-1071, 2021.
- 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.
- SOARES, F. A. *et al.* Perfil de sensibilização a alérgenos domiciliares em pacientes ambulatoriais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, s. n., p. 25-28, 2007.

TAKETOMI, E. A. *et al.* Allergen-Specific Immunotherapy Follow-Up by Measuring Allergen-Specific IgG as an Objective Parameter. In: **Immunotherapy - Myths, Reality, Ideas, Future**. InTech, p. 382-401, 2017.

TOHIDINIK, H. R.; MALLAH, N.; TAKKOUICHE, B. History of allergic rhinitis and risk of asthma; a systematic review and meta-analysis. **World Allergy Organization Journal**, v. 12, n. 10, p. 100069, 2019.

VALENTA, R. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. **Nature Reviews in Immunology**, v. 2, n. 6, p. 446–53, 2002.

VAN REE, R., *et al.* Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 27, n. 1, p. 68-74, 1997.

VERI, M. C. *et al.* Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fc γ -receptor IIB (CD32B) from the activating Fc γ -receptor IIA (CD32A): Biochemical, **Biological and Functional Characterization**. v. 121, n. 3, p. 392-404, 2007.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. **Frontiers in Immunology**, v. 5, s. n., p. 520, 2014.

VIEIRA, F. M. Modificações atuais da agricultura no Sul do Brasil: *Lolium sp* e Polinose em "uma nova visão". **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 5, n. 4, p. 433-434, 2021.

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.

ZHANG, J. *et al.* Innate Mechanisms in Selective IgA Deficiency. **Frontiers Immunology**, v. 12, s. n., p. 1–17, 2021.

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**, v. 2017, s. n., p. 1–10, 2017.

ANEXO A – 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. Arnaldo Carlos Porto Neto	Tel.: (54) 3312- 2714
Dr. Nelson Augusto Rosário Filho	Tel.: (41) 3339-4486
Dr. Herberto Jose Chong Neto	Tel.: (41) 3016-4800

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 B – 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 C – QUESTIONÁRIO ISAC - ASMA**CODIGO:** _____ **DATA:** _____**Por favor, responda as questões de 1 a 6.**

Circule 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

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

