



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

KARINA SANTOS SILVA

NÍVEIS DE IgG1, IgG2, IgG3 E IgG4 ESPECÍFICOS A ANTÍGENOS DE POLÉN DE
***Lolium multiflorum* EM PACIENTES COM POLINOSE NO SUL DO BRASIL**

Uberlândia
2024

KARINA SANTOS SILVA

**NÍVEIS DE IgG1, IgG2, IgG3 E IgG4 ESPECÍFICOS A ANTÍGENOS DE POLÉN DE
Lolium multiflorum EM PACIENTES COM POLINOSE NO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia.

Orientadores:

Prof. Dr Ernesto Akio Taketomi (10/2020-07/2024)

Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins (08/2024 - coordenador do programa)

Uberlândia
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586n
2024 Silva, Karina Santos, 1996-
Níveis de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicos a antígenos de polén de *Lolium multiflorum* em pacientes com polinose no sul do Brasil [recurso eletrônico] / Karina Santos Silva. - 2024.

Orientador: Ernesto Akio Taketomi.

Orientador: Carlos Henrique Gomes Martins

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.5238>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

I. Imunologia. I. Taketomi, Ernesto Akio, 1953-, (Orient.). II. Martins, Carlos Henrique Gomes, 1968-, (Orient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

André Carlos Francisco
Bibliotecário Documentalista - CRB-6/3408

KARINA SANTOS SILVA

**NÍVEIS DE IgG1, IgG2, IgG3 E IgG4 ESPECÍFICOS A ANTÍGENOS DE POLÉN DE
Lolium multiflorum EM PACIENTES COM POLINOSE NO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Uberlândia, 27 de Setembro de 2024.

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa - (Presidente)

Dra. Priscila Ferreira de Sousa Moreira – HC/UFU (Titular)

Profº. Dr. Sergio Eustáquio Lemos da Silva – UNITRI (Titular)

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, e
a todos os meus familiares e colegas, pelo
estímulo, companheirismo, carinho e
compreensão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus, pois sem ele eu não teria forças para continuar e seguir em frente. Por meio das minhas orações, o Senhor mostrou qual seria a melhor decisão, e posso afirmar: seguir em frente foi a melhor escolha.

Agradeço ao meu marido, Vitor Simão, que esteve ao meu lado com toda parceria. Esta conquista é nossa, e juntos realizaremos todos os nossos sonhos. Meus agradecimentos a todos os meus familiares: à minha mãe, madrinha Sônia, irmãos Kamila e Laerte Neto, sobrinhos, sogro(a), primos(as), cunhada, tios(as), Amanda e Valéria. Mesmo sem citar todos os nomes, vocês sabem o quanto sou grata por terem seguido comigo, cuidando e zelando pelo meu filho Rafael Simão, um ser tão pequeno, amável, abençoado por Deus e compreensivo, que me tornou uma mulher-mãe melhor. Te amo! Em especial, quero agradecer ao meu pai, meu avô Laerte e minha madrinha Silvana por embarcarem comigo nas viagens de ida e volta, nunca me deixando sozinha. Saibam que foi graças a vocês que consegui ter forças e segurança.

Agradeço aos meus amigos, e especialmente à Érika Viviane, por todo apoio, conselhos e por confiar em mim. Você não me deixou desistir, me ensinou a pegar estrada e fez tudo para que eu pudesse chegar até aqui. Você é um grande exemplo de mulher. Esta conquista é nossa. Obrigada!

Agradeço ao Ernesto Taketomi, meu orientador, por toda paciência, incentivo, motivação e orientação nesta caminhada acadêmica. O senhor é um excelente profissional. Não sei se demonstrei totalmente quem sou, mas me orgulho de ter seguido com o senhor. Obrigada! Sem o senhor, eu não teria conseguido obter este título, que muito orgulhará na minha trajetória.

Agradeço também ao professor Rafael, por não ter desistido de mim e ter feito o melhor para que eu pudesse continuar dando o meu melhor para concluir o mestrado. Sempre apoiando, incentivando e buscando as melhores alternativas para me apoiar, sejam elas as mais leves ou as mais difíceis de aceitar.

Agradeço imensamente aos meus colegas do LALIC, em especial Laura, Thiago, Alessandro e Vinicius. Mediante todas as circunstâncias, vocês me ajudaram a seguir em frente, obtendo os melhores resultados possíveis. Obrigada por todo ensinamento, paciência e acolhimento.

Espero um dia poder retribuir. Vocês foram fundamentais para que eu pudesse superar os desafios e alcançar meus objetivos. Contem comigo.

Agradeço ao coordenador do Programa de Pós-graduação, Carlos Henrique, e às secretárias do programa, por todo carinho, orientação e apoio ao longo desta jornada.

Obrigada aos membros pelo aceite na minha qualificação e defesa.

Não foi fácil, e houve muitos momentos em que pensei em desistir. No entanto, cada um de vocês, de maneira especial, contribuiu para que eu encontrasse a força e a determinação necessárias para continuar. Esta conquista é um testemunho do apoio incondicional, da fé e da resiliência que vocês me ajudaram a desenvolver.

Peço desculpas se minha postura em algum momento não refletiu o meu verdadeiro apreço e respeito por todos vocês.

A cada um que, de alguma forma, me incentivou a seguir em frente, mesmo quando as circunstâncias eram desafiadoras, meu mais sincero obrigado.

Muito obrigada a todos!

“Não importa que você vá devagar, contanto que você não pare.”

- Confúcio

RESUMO

Polinose é uma rinite alérgica sazonal que ocorre quando a exposição a aeroalérgenos, como o pólen de gramíneas, desencadeia um processo inflamatório, causando uma resposta alérgica respiratória em indivíduos sensibilizados. A sensibilização a um alérgeno demonstra a capacidade do alérgeno de provocar uma resposta das células Th2, enquanto IL-4 e IL-13 estimulam a produção de IgE, induzindo a troca de classe de imunoglobulina nas células B. O estudo envolveu 50 participantes, homens e mulheres, com idades entre 15 e 61 anos, diagnosticados com rinite alérgica sazonal em Caxias do Sul, RS. Dentre eles, 39 indivíduos (17 homens, 43,59% / 22 mulheres, 56,41%) apresentaram resultados positivos tanto no teste de picada cutânea (TCP) quanto no ELISA-IgE específico para o extrato de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm). Adicionalmente, 11 indivíduos com resultados negativos tanto no TCP quanto no ELISA-IgE foram selecionados como grupo controle. A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$. Foi realizada uma análise de correlação para examinar a relação entre anticorpos específicos para o extrato de Lm e o tamanho da pápula. A análise revelou que os níveis de anticorpos IgG específicos anti-Lm não apresentaram correlação significativa com os resultados do TCP, tanto em indivíduos atópicos ($r=0,1443$; $p=0,3278$) quanto não atópicos ($r=-0,01537$; $p=0,9174$). No entanto, foi observada uma forte correlação positiva entre os níveis de IgE específica e os resultados do TCP ($r=0,6024$; $p<0,0001$). Os níveis de IgE mostraram uma forte correlação com a reatividade do TCP enquanto as subclasses de IgG exibiram correlações fracas ou nenhuma correlação significativa. Isso sugere que a resposta alérgica mediada por IgE na polinose, operando de forma independente da IgG específica. Compreender essas respostas imunológicas em indivíduos atópicos e não atópicos é crucial para personalizar os tratamentos para alergias, especialmente na imunoterapia específica para alérgenos (ITE), onde a modulação da resposta imunológica por meio da IgG4 pode ter um impacto significativo.

Palavras-chave: Gramíneas; *Lolium multiflorum*; Rinite alérgica.

ABSTRACT

Pollinosis is a seasonal allergic rhinitis that occurs when exposure to aeroallergens, such as grass pollen, triggers an inflammatory process, causing a respiratory allergic response in sensitized individuals. Sensitization to an allergen demonstrates the allergen's ability to provoke a Th2 cell response, while IL-4 and IL-13 stimulate IgE production, inducing class switching of immunoglobulins in B cells. The study involved 50 participants, both men and women, aged between 15 and 61 years, diagnosed with seasonal allergic rhinitis in Caxias do Sul, RS. Among them, 39 individuals (17 men, 43.59% / 22 women, 56.41%) had positive results in both the skin prick test (SPT) and the ELISA-IgE specific for *Lolium multiflorum* (Lm) pollen extract. Additionally, 11 individuals with negative results in both the SPT and the ELISA-IgE were selected as the control group. Statistical significance was considered with $p < 0.05$. A correlation analysis was performed to examine the relationship between specific antibodies to the Lm extract and the size of the wheal. The analysis revealed that specific anti-Lm IgG antibody levels did not show a significant correlation with the SPT results, both in atopic ($r=0.1443$; $p=0.3278$) and non-atopic ($r=-0.01537$; $p=0.9174$) individuals. However, a strong positive correlation was observed between specific IgE levels and SPT results ($r=0.6024$; $p<0.0001$). IgE levels showed a strong correlation with SPT reactivity, while IgG subclasses displayed weak or no significant correlation. This suggests that the IgE-mediated allergic response in pollinosis operates independently of specific IgG. Understanding these immune responses in atopic and non-atopic individuals is crucial for personalizing allergy treatments, especially in allergen-specific immunotherapy (AIT), where modulation of the immune response through IgG4 may have a significant impact.

Keywords: Grass; *Lolium multiflorum*; Allergic rhinitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** Resposta imune inata e adaptativa no desenvolvimento das doenças alérgicas..... 17
- Figura 2 -** Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 14%, corado com Azul de Coomassie, (1) Faixa 1, padrão de peso molecular em kiloDaltons (kDa); (2) Faixa 2, extrato total de pólen de *Lolium multiflorum*..... 27
- Figura 3 -** Correlação entre os níveis de anticorpos IgE e IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicos para o extrato total de pólenes de *Lolium multiflorum*, determinados por ELISA, em indivíduos atópicos e não atópicos, e TCP (teste de punctura cutânea), são representados em (A, B, C e D), respectivamente. Os valores são expressos em O.D. A correlação foi analisada utilizando o teste de *Spearman*. As barras horizontais e verticais indicam a mediana, e a linha tracejada indica o valor de corte (1,2 e 3,0). Os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (**** $p < 0,0001$)..... 29
- Figura 4 -** Matriz de correlação entre TCP e os níveis de subclasses de anticorpos das classes IgE, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 ao extrato bruto de pólenes 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*. * $p < 0,0001$ 30
- Figura 5 -** Níveis séricos de anticorpos IgE e subclasses de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicos para o extrato de pólen de *Lolium multiflorum*, determinados por ELISA, em indivíduos atópicos (AT) e não atópicos (NAT), expressos em índice ELISA (IE). (A) Anti-Lm IgE, (B) Anti-Lm IgG1, (C) Anti-Lm IgG2, (D) Anti-Lm IgG3 e (E) Anti-Lm IgG4. Os dados paramétricos foram analisados utilizando o teste t para amostras independentes, e os dados não paramétricos foram analisados utilizando o teste de *Mann-Whitney*. A linha tracejada indica o limiar de positividade valor do cut-off (1,2). Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$. **** $p < 0,0001$ 31

Figura 6 -	Correlação de IgE anti Lm com subclasses de anticorpos IgGs específicos para o extrato total de pólen de <i>L. multiflorum</i> em indivíduos atópicos e não atópicos, expressos em índice ELISA (A, B, C e D). Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$	33
Figura 7 -	Correlação de IgG2 entre subclasses de IgG específicas para o extrato total de pólen de <i>L. multiflorum</i> em indivíduos atópicos e não atópicos, expressos em índice ELISA (A, B e C). Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$	34
Figura 8 -	Correlação de IgG3 entre subclasses de IgGs específicas para o extrato total de pólen de <i>L. multiflorum</i> em indivíduos atópicos e não atópicos, expressos em índice ELISA (A, B e C). Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados clínicos e socioeconômicos.....	26
-------------------	---------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PMSF	Adição de inibidor de protease
AT	Atópico
<i>β-expansinas</i>	beta expansina
APCs	Células apresentadoras de antígeno
MHC-II	Complexo de histocompatibilidade de classe II
O.D.	Densidade óptica
D.	<i>Dermatophagoides</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
HCL	Ácido clorídrico
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG2	Imunoglobulina G subclasse 2
IgG3	Imunoglobulina G subclasse 3
IgG4	Imunoglobulina G subclasse 4
ITE	Imunoterapia Específica
IE	Índice ELISA
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-9	Interleucina 9
IL-13	Interleucina 13
IL-25	Interleucina 25
IL-33	Interleucina 33
ITIMs	Motivos de inibição baseados em tirosina
LALIC	Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica
TSLP	Linfopoietina estromal tímica
LPS	Lipopolissacarídeos
<i>L. multiflorum</i>	<i>Lolium multiflorum</i>
Lm	<i>Lolium multiflorum</i>
NAT	Não atópico
PARs	Receptores ativados por proteases

SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio-eletroforese Vertical em Gel de Poliacrilamida
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
PBS-T	Solução Salina Tamponada com Fosfato e Tween
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfatos
BSA	Bovine Serum Albumin
Th2	T helper 2
TCP	Teste Cutânea de Puntura
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLRs	Toll-like receptors
GATA-3	<i>GATA binding protein 3</i>
CEP-UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Doenças Alérgicas	12
1.2 Rinite alérgica.....	13
1.3 Polinose.....	14
1.4 Resposta imune Inata e Adaptativa na progressão de doenças alérgicas respiratórias .	16
1.5 Papel das IgGs frente a doenças alérgicas	18
1.6 <i>Lolium multiflorum</i> (Lm).....	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. METODOLOGIA.....	21
3.1 Aspectos éticos	21
3.2 Seleção de pacientes com rinite alérgica sazonal e indivíduos controles	21
3.3 Preparação do extrato alergênico de polens de <i>Lolium multiflorum</i>	21
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional (SDS-PAGE).....	22
3.5 Teste Cutâneo de Puntura	22
3.6 Coleta de sangue	23
3.7 ELISA para detecção de IgE sérica específica a <i>L. multiflorum</i>	23
3.8 ELISA para detecção de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicos aos alérgenos do pólen <i>L. multiflorum</i>	24
3.9 Análise estatística	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Caracterização demográfica e clínica dos pacientes.....	26
4.2 Perfil proteico do extrato total de <i>Lolium multiflorum</i>	27
4.3 Correlação do teste cutâneo para pólen de <i>L. multiflorum</i> com anticorpos IgE, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.....	27
4.4 Níveis de anticorpos específicos IgE e subclasses de IgG para o extrato de pólen bruto de <i>L. multiflorum</i> em indivíduos atópicos e não atópicos	30
4.5 Correlações entre os níveis de IgE e subclasses de IgG específicos para o extrato alergênico de pólen de <i>Lolium multiflorum</i> em indivíduos atópicos e não atópicos	32
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO.....	40

REFERÊNCIAS.....	41
8. ANEXOS.....	48
ANEXO A.....	48
ANEXO B.....	51
ANEXO C.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Alérgicas

Clemens von Pirquet em 1906, ao investigar as respostas incomuns do sistema imunológico, idealizou o termo “alergia” para caracterizar “reatividade imune modificada” do organismo, quando em contato com substâncias exógenas. Devido à complexidade, o termo foi amplamente associado as reações específicas de hipersensibilidade imunológica, contra antígenos estranhos inofensivos (HUBER, B., 2006). Essa reatividade imunológica, assemelha-se as reações de hipersensibilidade imunológica, classificada em quatro etiologias distintas e mutuamente exclusivas, de acordo com Gell e Coombs (DESCOTES; CHOQUET-KASTYLEVSKI, 2001). Dentre os tipos de reações de hipersensibilidade, o termo "alergia" é comumente associado à reação do tipo I ou imediata. Esta forma de hipersensibilidade é caracterizada pela participação dos anticorpos da classe Imunoglobulina E (IgE) e sua ligação aos receptores de alta afinidade presentes nos mastócitos e basófilos. Quando o indivíduo é exposto a um componente alérgeno específico, ocorre uma resposta imunológica exacerbada, com a produção de altos níveis de IgE. Os anticorpos específicos aos alérgenos interagem com receptores celulares nos mastócitos e basófilos, desencadeando a liberação de mediadores inflamatórios, como a histamina, resultando em manifestações clínicas prejudiciais a homeostase do organismo (BALDACARA *et al.*, 2013).

As doenças alérgicas são as condições imunológicas crônicas mais prevalentes, e indivíduos com predisposição genética a produzir anticorpos IgE em resposta a doses baixas de alérgenos, desencadeiam dermatite atópica, asma ou rinite alérgica, estes, afetando estimadamente mais de 400 milhões de pessoas em todo o mundo, respectivamente (LANGAN *et al.*, 2020; GREINER *et al.*, 2011).

A predisposição genética dos indivíduos frente a um alérgeno é conhecida como “atopia”, termo definido por Coca e Cooke em 1923 (RING, J., 2014). Os alérgenos podem ser provenientes de diversas fontes, como grãos de pólen, ácaros da poeira domiciliar e epitélio de animais domésticos. Além disso, também podem ser encontrados em alimentos como leite de vaca, ovos, trigo, soja, amendoim, castanhas, frutas, frutos do mar, entre outros. Ademais, existem outros fatores desencadeantes de reações alérgicas em indivíduos atópicos, como picadas de insetos da ordem Hymenoptera e certos medicamentos (HUANG *et al.*, 2022).

Recentemente, ao estudar como as doenças alérgicas se desenvolvem ao longo da vida, foi observado que a indução de respostas imunes do tipo 2, mediadas por células T helper 2

(Th2), aumenta a suscetibilidade dos indivíduos a respostas respiratórias alérgicas. Os resultados indicaram que determinadas condições alérgicas tendem a predominar e surgir com maior frequência em faixas etárias específicas (GOKSÖR *et al.*, 2016; FALCON; CAOILI, 2023).

O envelhecimento celular, que está associado ao estresse oxidativo e ao aumento da expressão de genes relacionados ao envelhecimento, pode contribuir para a exacerbação de doenças respiratórias alérgicas, como rinite alérgica e asma brônquica (PIÑEIRO-HERMIDA *et al.*, 2021).

Atualmente, observa-se que os índices das condições de doenças alérgicas aeroalérgicas vêm aumentando significativamente em muitas regiões urbanas do Brasil, com registros de bronquite asmática, dermatite flexural, rinite, eczema, inflamação nasal e conjuntivite alérgica. Esse fenômeno pode estar associado ao aumento da poluição atmosférica, redução do contato precoce com substâncias alérgicas na primeira infância, diminuição da estimulação do sistema imunológico e exposição à fumaça do tabaco (RING *et al.*, 2001; SERPA *et al.*, 2015).

As doenças alérgicas representam um desafio significativo para a saúde pública devido à sua crescente prevalência e impacto na qualidade de vida dos pacientes. Essas condições alérgicas, como a asma e a rinite alérgica, estão se tornando cada vez mais prevalentes em todo o mundo, afetando milhões de pessoas e gerando uma carga substancial de morbidade (OBER; YAO, 2011; WANG *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2023).

Portanto, diversos fatores podem contribuir para o desenvolvimento e aumento da prevalência de doenças alérgicas. A ausência de tratamento em pacientes com alergias pode resultar na transição de uma inflamação moderada para condições mais graves, com manifestações que representem risco à vida do paciente (LAUGHTER *et al.*, 2021). A imunoterapia alérgeno-específica é a opção mais eficaz para interromper a progressão das alergias, enquanto terapêuticas medicamentosas, incluindo o uso de antialérgicos, ajudam a amenizar os sintomas (MONTSERRAT *et al.*, 2020).

1.2 Rinite alérgica

A rinite é amplamente caracterizada como uma inflamação da mucosa nasal, sendo um distúrbio frequente que atinge até 40% da população, causando danos substanciais na qualidade de vida, padrões de sono e rendimento profissional, podendo ser desencadeada por fatores alérgicos, não alérgicos, infecciosos, hormonais, ocupacionais e outros (SMALL *et al.*, 2007).

A resposta inflamatória frente a um alérgeno é o maior divisor frente a imunidade adquirida, algumas pesquisas relatam que pelo menos um dos pais alérgicos é um fator decisivo para que crianças e jovens de até 20 anos tenham maior prevalência a rinite alérgica, em comparação a indivíduos cujo seus progenitores não possuem histórico de reações alérgicas (KEIL *et al.*, 2010). Todavia algumas pesquisas mostram que crianças que habitam perímetro urbano tem maior prevalência em reações alérgica que as que estão na zona rural (SHPAKOU *et al.*, 2012).

Destacando a rinite alérgica sazonal, também conhecida como polinose, são prevalentes desde 1940 no Brasil (SMALL; KEITH; KIM, 2018). A contagem de alérgenos dispersos por aerossóis em diversas regiões do país são estudadas desde os primeiros casos gerados por polinose. Após estudos, foi visto que as regiões sudeste e sul são com mais casos registrados de doenças alérgicas respiratórias, decorrentes a inalação do pólen dispersos no ambiente (ARAUJO; ROSARIO; MARI, 2016; MOREIRA *et al.*, 2015).

Esses alérgenos (pólens) liberados durante o início da primavera, comum em áreas com estações climáticas bem definidas, sujeitas à influência continental e com latitude elevada, podem causar uma série de sintomas e incômodos, incluindo prurido nasal, espirros, coriza, congestão nasal e, frequentemente, hiperemia conjuntival. Tinha-se o entendimento no passado que a doença era uma circunstância que acometia exclusivamente as vias aéreas, posterior esta constatação foi esclarecida, sendo comprovado que acomete sistematicamente outras áreas funcionais do corpo, como a pele causando dermatite atópica (DYKEWICZ; HAMILOS, 2010; BARTLE, 2016; CASTILLO VIZUETE *et al.*, 2019; KAKLI; RILEY, 2016; PANDEY, 2016).

1.3 Polinose

A polinose ou rinite alérgica sazonal, onde o mecanismo de ativação do processo inflamatório é decorrente a exposição ao aeroalérgeno, grão de pólen, ocasionando resposta alérgica respiratória em indivíduos sensibilizados. Este acometimento respiratório que é desencadeado por este antígeno afeta drasticamente a qualidade de vida das pessoas de diferentes idades retirando a plena homeostase (SOPELETE *et al.*, 2006; YAMADA; SAITO; FUJIEDA, 2014).

A polinose em outrora já foi chamada de febre do feno, tal nomenclatura foi desmistificada pela ciência, pois foi comprovado cientificamente que não há relação nenhuma que o feno é o agente causador e tampouco desencadeia febre. Sabe-se que a rinite alérgica sazonal, é causada pela inalação do pólen suspenso no ar, e que este seja o causador do processo

inflamatório. Essa sazonalidade fica evidente quando através de estudos ficou comprovado que os sintomas aparecem em meados de setembro início da estação da primavera onde a disseminação do pólen ocorre por dispersão e de maneira exacerbada (BARTLE, 2016; CASTILLO VIZUETE *et al.*, 2019; KAKLI; RILEY, 2016; PANDEY, 2016).

Em um estudo, envolvendo pacientes jovens de 18 a 26 anos, foram identificados diversos fatores de risco associados à presença de doenças alérgicas, demonstrando que certas condições afetam predominantemente homens, como a asma, especialmente entre aqueles com histórico de tabagismo e exposição a cães e gatos em casa, além da presença de alergias na história familiar. Por outro lado, eczema e erupções cutâneas, foram mais frequentemente observadas em mulheres, enquanto aqueles que convivem com cães e gatos têm maior probabilidade de desenvolver duas ou mais doenças alérgicas (ZIYAB, 2017).

Na inalação, as partículas alergênicas são retidas pelo muco nasal, onde proteínas alergênicas são liberadas e difundidas nos tecidos nasais. Estudos sobre asma indicam que, uma vez nos tecidos nasais, os aeroalérgenos comuns não apenas passam por processos de apresentação de antígenos para desencadear respostas alérgicas específicas, mas também promovem o desenvolvimento de doenças alérgicas das vias aéreas devido às suas propriedades intrínsecas. Tal como, as atividades de protease de vários aeroalérgenos comuns podem facilitar a penetração do alérgeno em células apresentadoras de antígenos, por meio da clivagem de junções estreitas no epitélio das vias aéreas e da ativação de receptores ativados por protease nas células epiteliais. As células epiteliais ativadas, por sua vez, estimulam a produção de citocinas, quimiocinas e linfopoiética estromal tímica, interagindo com células dendríticas inter e subepiteliais, alterando o desenvolvimento de células T e a sensibilização alérgica adaptativa (BOUSQUET *et al.*, 2008; HAMMAD; LAMBRECHT, 2008). A sensibilidade ao pólen pode passar despercebida e ser mascarada por outras hipersensibilidades, o que pode modificar o quadro clínico típico em determinadas situações (VIEIRA, 1995).

Os grãos de pólen das gramíneas contêm uma ampla variedade de proteínas com diferentes estruturas e funções. Entre essas proteínas, os alérgenos do grupo 1, conhecidos como beta expansina (β -*expansinas*), são encontrados em todas as subfamílias de Poaceae e podem representar até 10% do total do grão de pólen. Exemplos dessas proteínas incluem Lol p 1, extraído de *Lolium perenne*, Poa p 1 de *Poa pratensis* e Phl p 1 de *Phleum pratense*. Outro grupo significativo são os alérgenos do grupo 5, que são exclusivos da subfamília Pooideae. Esses dois grupos são considerados imunodominantes nos pólenes de gramíneas devido à sua alta reatividade com anticorpos IgE em diversos estudos. Além disso, proteínas como as do grupo 13, os panalérgenos dos grupos 7 e 12, e outros com menor reconhecimento, como os

dos grupos 2, 4, 23 e 24, também desempenham papéis importantes (DAVIES *et al.*, 2008; GARCÍA-MOZO, 2017; KAILAIVASAN; DAVIES, 2018; TIMBRELL *et al.*, 2014).

O diagnóstico da polinose é desafiador, e, por essa razão, têm sido desenvolvidas diversas abordagens para alcançar uma avaliação precisa. A detecção da IgE específica para o pólen tem sido reconhecida como um indicador precoce da rinite alérgica sazonal, representando um avanço significativo, pois pode ser identificada na maioria dos indivíduos antes do surgimento dos primeiros sintomas alérgicos sazonais (HATZLER *et al.*, 2014; MARK *et al.*, 2020).

1.4 Resposta imune Inata e Adaptativa na progressão de doenças alérgicas respiratórias

Os alérgenos que entram em contato com o organismo humano podem desencadear uma série de respostas imunes complexas. Quando essas substâncias estranhas, como os alérgenos, atravessam a barreira epitelial, o sistema imunológico inato reage rapidamente para reconhecer e neutralizar essas ameaças (EIFAN; DURHAM, 2016; MELUM *et al.*, 2014; TAKETOMI *et al.*, 2017). As células apresentadoras de antígeno (APCs), como os macrófagos e as células dendríticas, desempenham um papel fundamental nesse processo ao capturar e processar os antígenos, que posteriormente são apresentados às células T *helper naive* por meio das moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC-II). A ativação das células T CD4+ *naive* ocorre por meio da interação com o MHC-II e a liberação de citocinas como a interleucina 4 (IL-4). Este processo envolve a ativação de vias de sinalização intracelular, como a *Signal transducer and activator of transcription 6* (STAT-6), que por sua vez ativa o fator de transcrição *GATA binding protein 3* (GATA-3). Esse conjunto de eventos leva à diferenciação das células T naive em células Th2 (BARNES, 2008; HO; PAI, 2007; HOLGATE; POLOSA, 2008), que são responsáveis pela produção de citocinas como interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 9 (IL-9) e interleucina 13 (IL-13), típicas das respostas alérgicas (CHAPLIN, 2010; LARCHÉ; AKDIS; VALENTA, 2006) (Figura 1).

Na figura 1, percebe-se que além do caminho tradicional de ativação imunológica, estudos sugerem que certos alérgenos com propriedades proteolíticas ou lipopolissacarídeos (LPS) podem causar danos diretos à barreira epitelial. Esses alérgenos ativam receptores específicos, como os receptores ativados por proteases (PARs) ou Toll-like receptors (TLRs), presentes nas células epiteliais. Esse processo desencadeia uma cascata pró-inflamatória que promove a produção de citocinas, como a linfopoietina estromal tímica (TSLP), interleucina 25

(IL-25) e interleucina 33 (IL-33), favorecendo o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th2. (BULEK *et al.*, 2010; DIVEKAR; KITA, 2015; GEORAS; REZAEI, 2014; LAMBRECHT; HAMMAD, 2014; TAKETOMI *et al.*, 2017).

Quando a resposta imune Th2 é estabelecida, as células B sofrem uma mudança de isotipo, passando a produzir IgE específica para o alérgeno. A IgE se liga aos receptores de alta afinidade em mastócitos e basófilos, preparando o organismo para uma resposta alérgica imediata na próxima exposição ao alérgeno (LARCHÉ; AKDIS; VALENTA, 2006; MIN, 2010). A reação alérgica pode ser dividida em duas fases principais: a fase imediata e a fase tardia. Na fase imediata, que ocorre dentro da primeira hora após a exposição ao alérgeno, mediadores pré-formados, como histamina e triptase, são liberados, causando os primeiros sintomas alérgicos. A fase tardia, que se desenvolve de 6 a 10 horas após a exposição, é caracterizada pela produção de mediadores neoformados, como prostaglandinas e leucotrienos, que prolongam a inflamação e intensificam os sintomas alérgicos (JAMES; DURHAM, 2008).

Essa resposta prolongada é exacerbada pela quimiotaxia de eosinófilos, que é o principal mecanismo na fase tardia. Essas células, juntamente com mastócitos e linfócitos T, migram para o local da inflamação, causando danos teciduais e perpetuando a resposta inflamatória, o que pode levar a sintomas crônicos nos indivíduos alérgicos (MIN, 2010; STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2010).

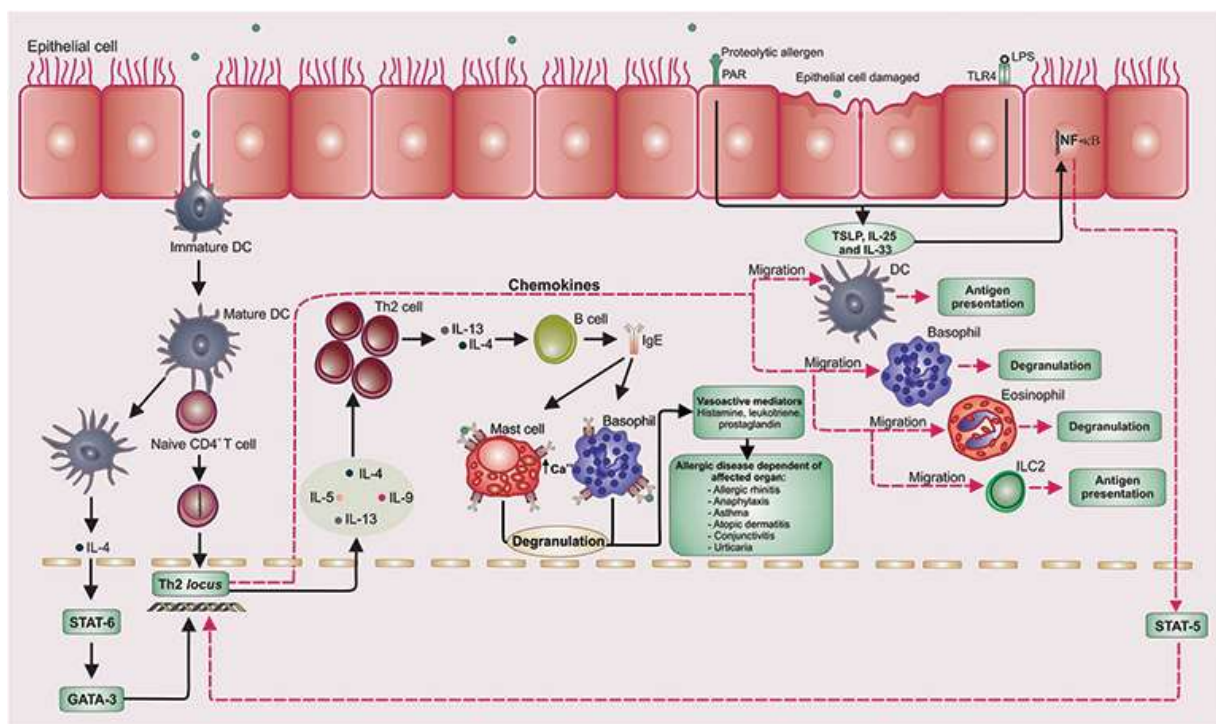


Figura 1. Resposta imune inata e adaptativa no desenvolvimento das doenças alérgicas
Fonte: (TAKETOMI *et al.*, 2017).

1.5 Papel das IgGs frente a doenças alérgicas

A produção de Imunoglobulina G (IgG) pode influenciar o desenvolvimento de doenças alérgicas, particularmente através da secreção de suas diferentes subclasses. A Imunoglobulina G subclasse 4 (IgG4), por exemplo, pode bloquear a interação da IgE com seus receptores ao competir pelo mesmo epítipo, e atua como um regulador por meio de diversos mecanismos. Essas imunoglobulinas podem se ligar a receptores de baixa afinidade, como o Fc γ RIIB (CD32B), presentes em células como monócitos, macrófagos, linfócitos B, mastócitos e basófilos. A ligação dos anticorpos a esses receptores ativa sinais inibitórios mediados pelos ITIMs (motivos de inibição baseados em tirosina), o que limita a ativação de outras vias e reduz a atividade celular, a produção de citocinas e a degranulação de mastócitos e basófilos (RANKIN *et al.*, 2006; QIN *et al.*, 2022).

Dessa forma, mesmo na presença do complexo Fc ϵ RI com IgE e alérgeno, a degranulação dos mastócitos não ocorre. Portanto, a ativação desses receptores pode servir como um mecanismo regulador nas doenças alérgicas. Embora essa função tenha sido bem descrita para a IgG4, outras subclasses também podem se ligar aos receptores Fc γ RIIb com eficácia similar. A ativação dos receptores por IgG3 e IgG2 ainda não é totalmente compreendida no contexto das doenças alérgicas (DE TAEYE *et al.*, 2019; VIDARSSON, 2014).

1.6 *Lolium multiflorum* (Lm)

Lolium multiflorum (Lm), conhecido popularmente como azevém italiano ou, em inglês, *Italian ryegrass*, pertence à família Poaceae, subfamília Pooideae e tribo Poeae. Esta planta foi introduzida no Brasil por imigrantes europeus, na literatura encontra-se poucas informações sobre a gramínea (BERNARDES *et al.*, 2010; ESTEVES *et al.*, 2000).

O gênero *Lolium*, pertencente à família Poaceae, tem como centro de origem o sul da Europa, Ásia Menor e norte da África. Compreende oito espécies diferentes da gramínea. Entre essas, as espécies, *L. perenne* e *L. multiflorum* se destacam pela ampla distribuição geográfica em regiões de clima temperado, devido à sua importância econômica como plantas forrageiras, com utilização na pecuária devido ao baixo custo, alta produção de grãos de pólen e capacidade de se propagar em diferentes ambientes (VARGAS *et al.*, 2018; BERNARDES *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2015; SOPELETE *et al.*, 2006).

L. multiflorum no Brasil, principalmente na Região Sul, é reconhecido por ser uma das principais fontes de alérgenos com potencial para sensibilizar indivíduos (BERNARDES *et al.*, 2010; SOPELETE *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar os níveis de anticorpos específicos para alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum* em amostras de soro de pacientes com polinose.

2.2 Objetivos específicos

- Testar e avaliar a sensibilização alérgica de indivíduos alérgicos ao pólen de *L. multiflorum*, por meio do TCP (Teste Cutânea de Puntura);
- Determinar os níveis séricos de anticorpos IgE específica a alérgenos de pólen de *L. multiflorum* em pacientes sensibilizados, por ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*);
- Quantificar os níveis séricos de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em pacientes com polinose, por ELISA.

3. METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

Essa pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU), sob número de protocolo 3.342.127 (Anexo 1).

Para a participação e concordância na pesquisa, os indivíduos precisaram confirmar pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1). Todos os pacientes foram submetidos a uma avaliação do histórico clínico, a qual foi conduzida por meio da aplicação de um questionário clínico. Esse questionário foi administrado pelo médico especialista Prof. Dr. Francisco de Assis Machado Vieira, renomado alergista e professor na Universidade de Caxias do Sul, RS, que estava encarregado do atendimento dos pacientes.

3.2 Seleção de pacientes com rinite alérgica sazonal e indivíduos controles

Um total de 50 pacientes, incluindo homens e mulheres com idades entre 15 e 61 anos e diagnosticados com rinite alérgica sazonal, foram recrutados em Caxias do Sul, RS. Entre eles, 39 pacientes (17 homens, 43,59% / 22 mulheres, 56,41%) testaram positivo para o Teste de Cutâneo de Puntura e ELISA-IgE para o extrato de pólen de *L. multiflorum*.

Adicionalmente, como controle do estudo foram selecionados 09 indivíduos com TCP e ELISA-IgE negativos para o extrato de *L. multiflorum*. Além deste grupo, 2 indivíduos com ELISA-IgE negativo e TCP positivo foram adicionados no estudo, com total de 11 indivíduos (3 homens, 27,27% / 8 mulheres, 72,73%).

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

Os grãos de pólen da gramínea *L. multiflorum*, foram coletados 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 do azevém italiano, compreendido entre setembro - dezembro, 2021. Após a coleta, os grãos de pólen de *L. multiflorum* foram mantidos em uma sala especial para secagem e posterior coleta em papel branco. Em seguida, grãos de pólen foram transferidos para tubos de ensaio e enviados ao Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica (LALIC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

A extração antigênica foi preparada conforme descrito por Sopelete *et al.* (2006). Para isso, foram utilizados 0,57g de grãos de pólen, com adição de inibidor de protease (PMSF 1,6mM, leupeptina 100 µg/mL, aprotinina 10 µg/mL) e 3mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 1% 0,01 M, pH 7,2, para as frações antigênicas. Essa mistura foi macerada, e submetida à extração por 18 horas a 4°C, com agitação orbital. Após esse período, o material foi fracionado em alíquotas de aproximadamente 1,75mL, o material foi centrifugado a 10.000 rpm a 4°C por 10 minutos e dialisado contra PBS durante a noite. O extrato proteico resultante foi mantido em tubos de armazenamento a -70°C para uso posterior nos testes.

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

Para demonstrar os principais componentes antigênicos do extrato total do *L. multiflorum*, foi utilizado a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições de desnaturação (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970) e adaptado com base no trabalho de Correa *et al.* (2019). As amostras foram preparadas em tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,1M pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2% e glicerol 20%, e foram aquecidas a 95°C por 5 minutos antes da aplicação nos géis. Os géis foram então submetidos à eletroforese, eletroforese vertical em gel de separação de 14% e em gel de empilhamento a 4% de acordo com os padrões de pesos moleculares. Após a separação, os géis foram corados com Coomassie blue e digitalizados utilizando um sistema ChemiDoc™ XRS+ e analisados no software Image Lab™ (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA) (LAEMMLI, 1970; CORREA *et al.*, 2019).

3.5 Teste Cutâneo de Puntura

Para o teste cutâneo de puntura para avaliação da hipersensibilidade imediata do pólen *L. multiflorum* foi conduzido conforme descrito por Ownby (1988). Para a realização dos testes, foram utilizados extratos alergênicos de ácaros (*Dermatophagoides (D.) 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 empregada solução salina fisiológica com glicerol a 50%, enquanto o controle positivo consistiu em cloridrato de histamina (10 mg/mL).

Em seguida, para as punções foi realizada assepsia da face interna do antebraço, e com ajuda de uma lanceta foram feitas pequenas perfurações, após aproximadamente uma gota de 10 µL do extrato alergênico foi depositada, mantendo-se uma distância de 3 cm entre os extratos. A leitura da reação foi efetuada após 15 minutos, com auxílio de paquímetro ou régua graduada em milímetros (mm), onde o tamanho médio de pápula igual ou superior a 3 mm em relação à pápula obtida com o controle negativo foi considerado como resultado positivo (OWNBY, 1988).

3.6 Coleta de sangue

Foram coletadas amostras de sangue de aproximadamente 20 mL de cada indivíduo por meio de punção venosa na região do antebraço, na mesma ocasião da realização dos testes cutâneos de punção. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 700 x g por 10 minutos, onde os soros obtidos foram divididos em alíquotas e armazenados a -20°C até serem submetidos a testes sorológicos.

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

Os anticorpos da classe IgE séricos específicos a *L. multiflorum* foram dosados por ensaio imunoenzimático convencional (cELISA), como já descrito na literatura (PEREIRA *et al.*, 2005). Nesse ensaio, utilizou-se 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 alergênico de *L. multiflorum*, produzidos em 2021, cuja identificação do frasco eppendorf foi Lm 21, diluídos com tampão Carbonato-Bicarbonato 0,06M pH 9,6, com concentração 20 µg/mL, com 50 µg/poço, overnight a 4 °C. As placas foram lavadas com Solução Salina Tamponada com Fosfato e Tween a 0,05% (PBS-T), com três lavagens, bloqueadas com PBS-T 0,05% adicionado de Soro Albumina Bovina (BSA) 1% - (Bovine Serum Albumin; Sigma, lote: SLBR6769V), por uma hora em temperatura ambiente.

As amostras de soros foram diluídas a 1:2 em duplicada, em volume de 50 µg/poço e incubadas a 37°C por duas horas em câmara úmida, utilizando como diluente PBS-T-BSA 1%, após cada etapa da reação as placas, foram lavadas com PBS-T 0,05%. Foram utilizados controle positivos e negativos nas placas. Subsequentemente, para adição do anticorpo secundário anti-IgE humana biotinizada (1:1000; Sigma-Aldrich) as placas foram submetidas a cinco lavagens com PBS-T 0,05%, e incubadas com diluição 1:1000, com volume de 50

$\mu\text{g/poço}$ por uma hora a 37°C em câmara úmida. Após este processo, todas as lavagens seguiram o mesmo padrão, de cinco lavagens com PBS-T 0,05% a cada ciclo. O conjugado Streptavidina/Peroxidase (Sigma) foi acrescentado na diluição de 1:1000 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Por fim, o último ciclo de revelação se deu 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% de peróxido de hidrogênio. A densidade óptica, também chamada de O.D., foi determinada a 405 nm em espectrofotômetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments, Inc., VT, EUA). Os resultados foram determinados por índice ELISA (IE).

3.8 ELISA para detecção de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicos aos alérgenos do pólen *L. multiflorum*

Anticorpos das subclasses IgG1 e IgG4 específicos para o pólen de *L. multiflorum* foram medidos por ensaio imunoenzimático convencional (cELISA). Utilizando placas de alta afinidade (Corning® 96-well EIA/RIA Clear Flat Bottom Polystyrene High Bind Microplate, embaladas individualmente, sem tampa, não estéreis), foram sensibilizadas com extrato alérgico de Lm 21 diluído em tampão Carbonato-Bicarbonato 0,06M pH 9,6, na concentração de $20 \mu\text{g/mL}$, com $50 \mu\text{g}$ por poço, durante a noite (overnight) a 4°C .

As placas foram lavadas com PBS-T 0,05%, em três etapas, sendo as placas para detecção de IgG1 e IgG3 bloqueadas com leite desnatado 1% em PBS-T por 1 hora à temperatura ambiente e para IgG2 e IgG3 bloqueadas com PBS-T 0,05% adicionado de BSA 2% (Sigma, lote: SLBR6769V), por uma hora em temperatura ambiente, com volume de $100 \mu\text{g/poço}$.

Após três lavagens com PBS-T 0,05%, as amostras de soro foram diluídas 1:5 e incubadas nas respectivas placas por duas horas a 37°C em ambiente úmido. Como controle foram utilizadas amostras de soro de indivíduos atópicos e não atópicos. Subsequente após este ciclo, as placas foram lavadas seis vezes para cada reação.

Para adição do anticorpo secundário, anticorpos anti-IgG2 humana biotinizada (1:500; Sigma), anti-IgG3 humana biotinizada (1:500; Sigma), anti-IgG1 humana biotinizado (1:1000; Sigma-Aldrich) e anti-IgG4 humana biotinizado (1:1000; Sigma-Aldrich) foram diluídas em PBS-T 0,05% adição de BSA (Sigma, lote: SLBR6769V). A seguir, as placas foram incubadas por uma hora em câmara úmida a 37°C , com volume de $50 \mu\text{g/poço}$. Terminado este tempo, as

placas foram lavadas em PBS-T e o conjugado Streptavidina/Peroxidase (Sigma), foi acrescentado na diluição de 1:1000, com volume de 50 µg/poço, durante 30 minutos, à temperatura ambiente (25°C).

A reação foi revelada pela adição de *2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)* (ABTS; Sigma-Aldrich) a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M pH 4,2, contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio.

A O.D. foi determinada a 405 nm em espectrofotômetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments, Inc., VT, EUA). Os resultados foram determinados por índice ELISA (IE).

3.9 Análise estatística

Para análise estatística utilizou-se o software *GraphPad Prism* versão 8.0 (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, EUA). O teste de Chi-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher, quando apropriado, foram aplicados a fim de analisar gênero, TCP e diagnóstico. Para analisar a idade dos indivíduos, tamanho médio das pápulas e o teste de ELISA foi empregado o teste de Mann-Whitney. Todos os resultados foram analisados, verificando o nível de significância ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização demográfica e clínica dos pacientes

Os indivíduos foram separados em dois grupos: o grupo atópico (AT) e o grupo não atópico (NAT), com base nos resultados do TCP e do teste de ELISA para detecção de anticorpos da classe IgE. As características demográficas e clínicas dos indivíduos incluídos na pesquisa estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Dados clínicos e socioeconômicos.

Características	Atópico	Não atópico	Valor de P
N	39	11	
Gênero ^a			
Masculino	17 (43,59%)	3 (27,27%)	0,4895ns
Feminino	22 (56,41%)	8 (72,73%)	
Idade ^b			
Mediana	32,65 (15-61)	32,89 (20-60)	0,9606ns
Teste de Punctura Cutânea (%) ^a			
Positivo	39 (100%)	0 (0%)	<0,0001****
Negativo	0 (0%)	11 (100%)	

^aTeste do Chi-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher, quando apropriado; ^bTeste de *Mann-Whitney*; ns = Não significativo; ****p<0,0001.

Fonte: Autoria própria.

A amostra foi composta por 39 indivíduos atópicos e 11 não atópicos. A distribuição por gênero não apresentou diferença estatisticamente significativa (p=0,4895), com 43,59% dos atópicos e 27,27% dos não atópicos sendo do sexo masculino, e 56,41% dos atópicos e 72,73% dos não atópicos sendo do sexo feminino. A mediana de idade foi semelhante entre os grupos, com 32,65 anos (variando de 15 a 61 anos) para os atópicos e 32,89 anos (variando de 20 a 60 anos) para os não atópicos, não havendo diferença significativa (p=0,9606).

Em relação ao TCP, todos os indivíduos do grupo atópico (100%) apresentaram resultado positivo, enquanto nenhum indivíduo do grupo não atópico apresentou positividade (p<0,0001). Essa diferença foi significativa. Por outro lado, como de se esperar todos os

indivíduos do grupo não atópico (100%) tiveram resultado negativo no teste de punctura cutânea, enquanto nenhum atópico apresentou negatividade.

4.2 Perfil proteico do extrato total de *Lolium multiflorum*

Correa *et al.* (2023) determinaram os perfis de bandas do extrato de *L. multiflorum* por meio de eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) a 14%, com coloração *Coomassie blue*. Esse procedimento permitiu a identificação e quantificação dos diferentes componentes alergênicos presentes no extrato, proporcionando uma avaliação detalhada de sua composição e potencial alergênico. As principais bandas identificadas no extrato total do alérgeno apresentaram pesos moleculares de 145, 102, 79, 69, 58, 47, 43, 38, 36, 32, 29, 26, 24, 18, 17 e 12 kDa, sendo que as bandas de 58, 32 e 12 kDa se destacaram pela maior intensidade. (Figura 2).

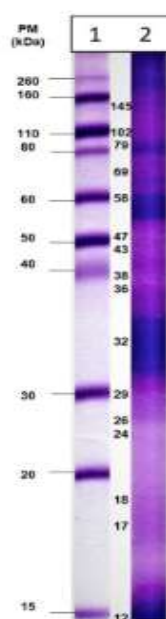


Figura 2. Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 14%, corado com Azul de Coomassie, (1) Faixa 1, padrão de peso molecular em kiloDaltons (kDa); (2) Faixa 2, extrato total de pólen de *Lolium multiflorum*.

Fonte: Correa *et al.*, 2023.

4.3 Correlação do teste cutâneo para pólen de *L. multiflorum* com anticorpos IgE, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4

Para avaliar a correlação entre os anticorpos específicos para o extrato de *L. multiflorum* e o tamanho da pápula, foi aplicado o teste de correlação de *Spearman*. Os resultados indicaram que os níveis de anticorpos específicos anti-*L. multiflorum* em indivíduos atópicos e não

atópicos não foram diretamente influenciados pelo resultado do TCP, conforme observado nos seguintes dados da Figura 3, onde os anticorpos IgG1 (B: $r=0,1443$; $p=0,3278$), IgG2 (C: $r=-0,01537$; $p=0,9174$) e IgG4 (E: $r=0,0480$; $p=0,7459$). Em contrapartida, foi identificada uma forte correlação positiva entre o resultado de TCP e os níveis específicos de anticorpos IgE ($r=0,6024$; $p<0,0001$) (A) e a subclasse IgG3 ($r=0,3295$; $p=0,0222$) (D) (Figura 3). Ao analisar os dados, observou-se que alguns indivíduos atópicos apresentaram resultados distintos, onde estes tiveram TCP para o extrato de *L. multiflorum* positivo, e níveis negativos de IgE específica, de acordo com o índice ELISA. Além disso, foi observado um caso de um indivíduo não atópico com TCP negativo, mas com níveis positivos de IgE específica, IgG1, IgG2 e IgG3 para o extrato de *L. multiflorum*, e níveis negativos de IgG4, não demonstrado na figura 3.

Para confirmar essas observações, uma matriz de correlação foi elaborada utilizando o teste de *Spearman*. Embora os níveis de IgE estivessem fortemente correlacionados com o TCP, o mesmo, não foi observado para as subclasses de IgG, sugerindo que o teste cutâneo pode não influenciar os níveis de anticorpos da classe IgG (Figura 4).

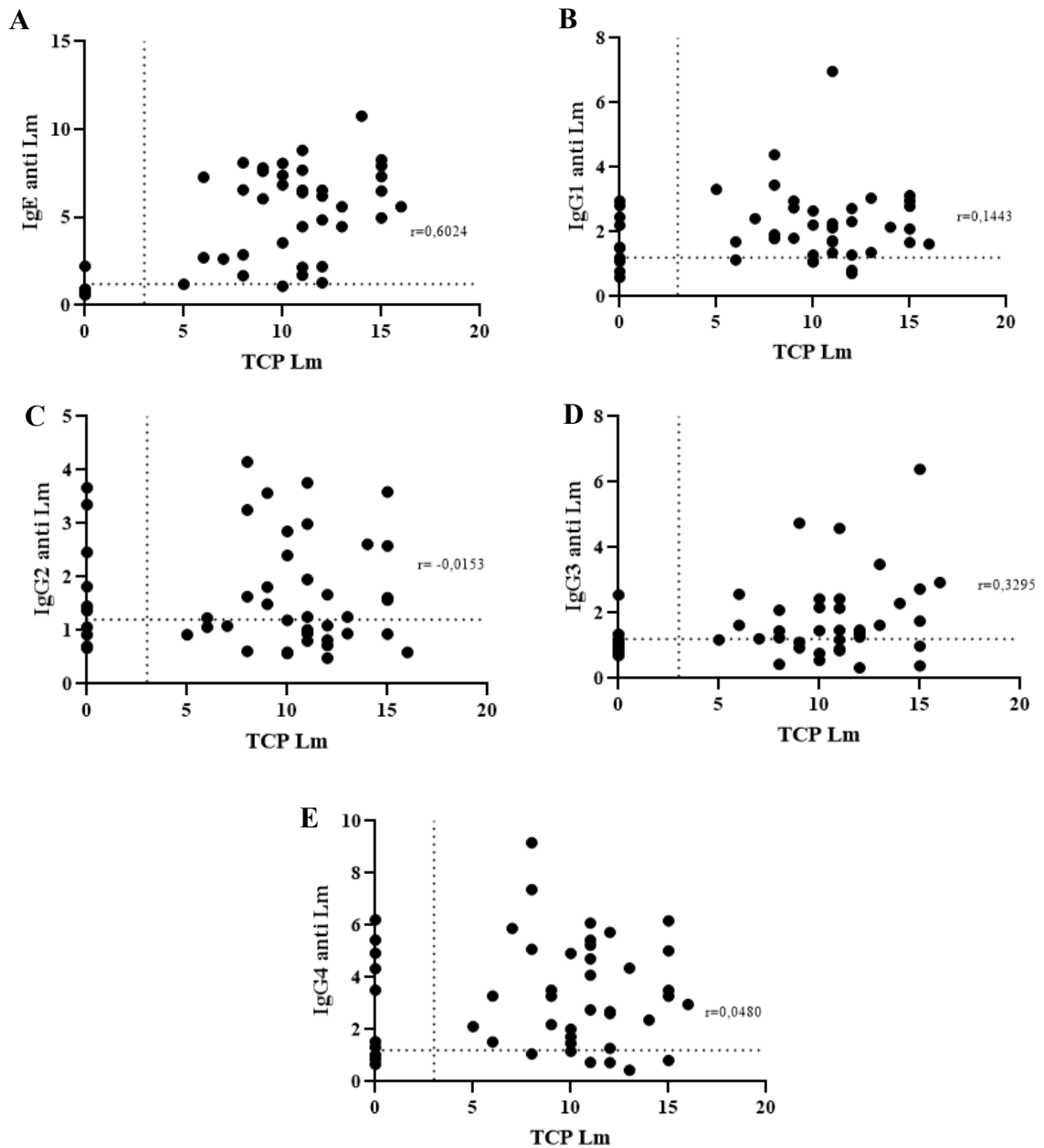


Figura 3. Correlação entre os níveis de anticorpos IgE e IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicos para o extrato total de pólenes de *Lolium multiflorum*, determinados por ELISA, em indivíduos atópicos e não atópicos, e TCP (teste de punctura cutânea), são representados em (A, B, C e D), respectivamente. Os valores são expressos em O.D. A correlação foi analisada utilizando o teste de *Spearman*. As barras horizontais e verticais indicam a mediana, e a linha tracejada indica o valor de corte (1,2 e 3,0). Os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (**** $p < 0,0001$).

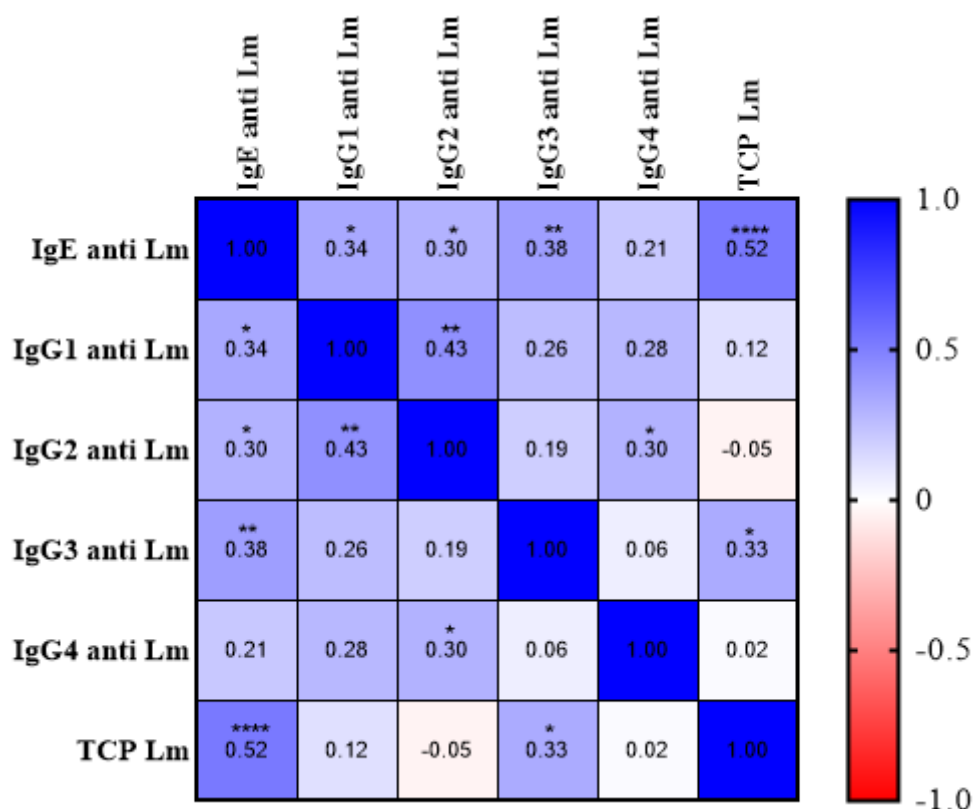


Figura 4. Matriz de correlação entre TCP e os níveis de subclasses de anticorpos das classes IgE, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 ao extrato bruto de pólen de *L. multiflorum*. A intensidade de coloração azul indica níveis de correlação positiva e a coloração vermelha indica correlação negativa. A coloração branca indica ausência de correlação. Os números centralizados nas células representam o valor de r determinado pelo Teste de Correlação de *Spearman*. * $p < 0,0001$.

4.4 Níveis de anticorpos específicos IgE e subclasses de IgG para o extrato de pólen bruto de *L. multiflorum* em indivíduos atópicos e não atópicos

Para avaliar os níveis de anticorpos específicos IgE, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 para o antígeno Lm, foram realizados o teste de *Mann-Whitney* e o teste *t* não pareado. Foram utilizados soros de dois grupos: não atópicos (NAT) e atópicos (AT), para IgE AT (n=39) NAT (n=11); IgG1 AT (n=39) NAT (n=11); IgG2 AT (n=39) NAT (n=11); IgG3 AT (n=39) NAT (n=11); e IgG4 AT (n=39) NAT (n=11).

Os resultados mostraram que os níveis de anticorpos IgE ($p < 0,0001$) (Figura 5A) e subclasse IgG3 ($p = 0,0226$) (Figura 5D) exibiram quantidades significativas de anticorpos no grupo AT em comparação com NAT, ambos apresentando $p < 0,05$. Observando os níveis de IgG1 ($p = 0,0778$) (Figura 5B), IgG2 ($p = 0,08490$) (Figura 5C) e IgG4 ($p = 0,3213$) (Figura 5E), verificou-se que entre os grupos AT e NAT não apresentaram diferença estatística.

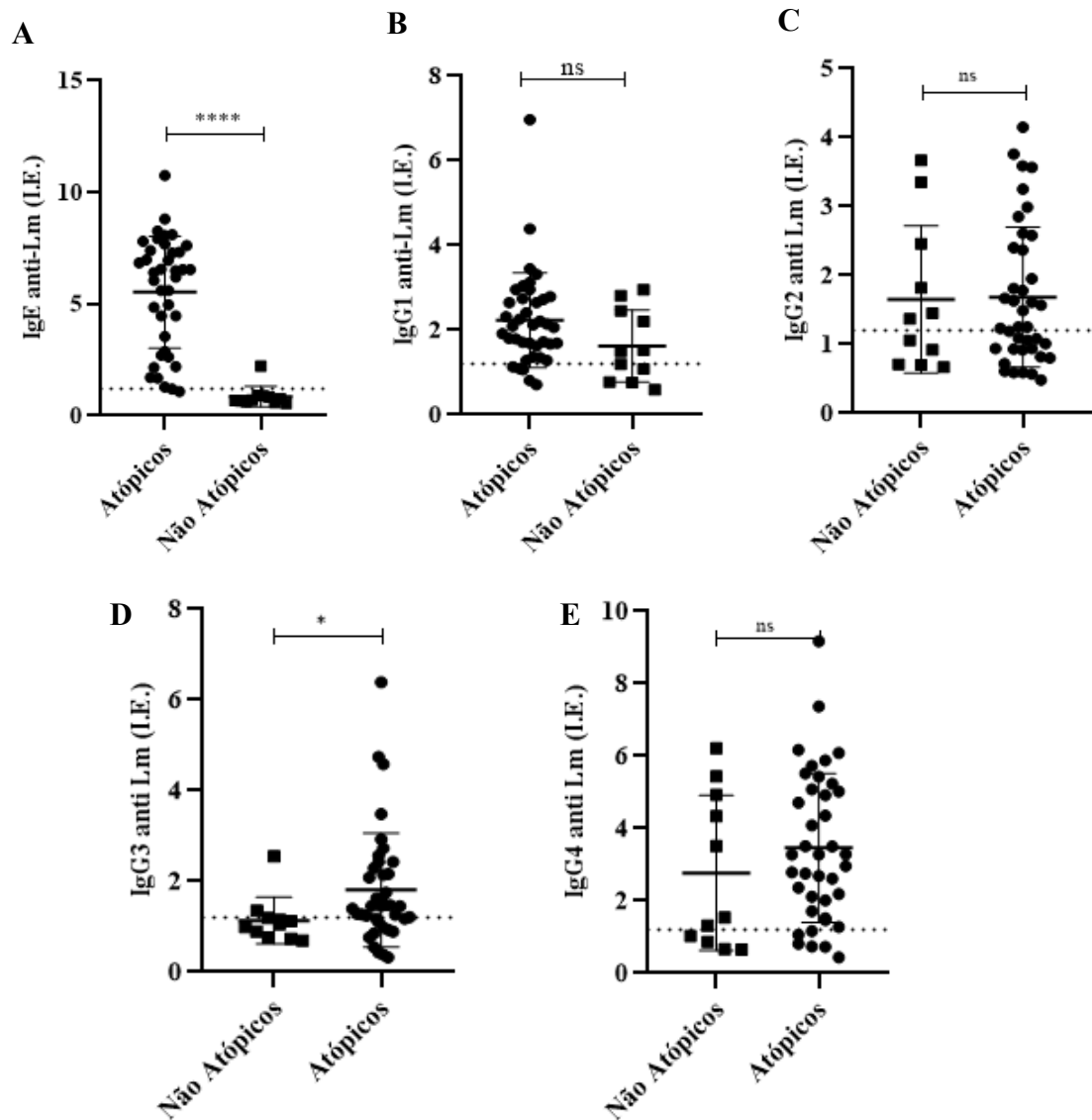


Figura 5. Níveis séricos de anticorpos IgE e subclasses de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicos para o extrato de pólen de *Lolium multiflorum*, determinados por ELISA, em indivíduos atópicos (AT) e não atópicos (NAT), expressos em índice ELISA (IE). (A) Anti-Lm IgE, (B) Anti-Lm IgG1, (C) Anti-Lm IgG2, (D) Anti-Lm IgG3 e (E) Anti-Lm IgG4. Os dados paramétricos foram analisados utilizando o teste t para amostras independentes, e os dados não paramétricos foram analisados utilizando o teste de *Mann-Whitney*. A linha tracejada indica o limiar de positividade valor do cut-off (1,2). Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$. **** $p < 0,0001$.

4.5 Correlações entre os níveis de IgE e subclasses de IgG específicos para o extrato alergênico de pólen de *Lolium multiflorum* em indivíduos atópicos e não atópicos

Para avaliar os níveis de anticorpos IgE, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em indivíduos com resultados positivos e negativos no ELISA, tanto atópicos quanto não atópicos, foi realizado o teste de correlação de *Spearman* para análise de dados não paramétricos e o teste de correlação de Pearson para análise de dados paramétricos. Ao analisar a correlação de IgE e os anticorpos das subclasses IgG1 ($r=0,3142$; $p=0,0263$) (Figura 6A), IgG2 ($r=0,1860$; $p=0,1960$) (Figura 6B), IgG3 ($r=0,4863$; $p=0,0003$) (Figura 6C) e IgG4 ($r=0,2069$; $p=0,1494$) (Figura 6D), observa-se que todos mostraram uma baixa correlação. Isso indica que em indivíduos com uma resposta alérgica aumentada de IgE, os níveis das subclasses de IgG não influenciam os níveis de IgE, significando que a resposta alérgica nesses indivíduos é mediada por IgE.

Ao analisar a correlação entre as subclasses de anticorpos IgGs (Figura 7), não tem uma forte correlação quando se trata de resposta alérgica, observando a correlação em A ($r=0,02235$; $p=0,8776$), B ($r=0,2224$; $p=0,1206$) e C ($r=-0,0073$; $p=0,9593$) (Figura 7); A ($r=0,1867$; $p=0,1941$); B ($r=0,0840$; $p=0,5619$) e; C ($r=0,649$; $p=0,6539$) (Figura 8), indicando que a IgE pode ser a principal imunoglobulina envolvida na resposta alérgica.

Na Figura 8, os resultados foram semelhantes: A ($r = 0,1867$; $p = 0,1941$), B ($r = 0,0840$; $p = 0,5619$) e C ($r = 0,649$; $p = 0,6539$). Novamente, as correlações são fracas e não significativas, o que reforça a ausência de uma relação importante entre as subclasses de IgG e a resposta alérgica. Dessa forma, os dados indicam que as subclasses de IgG não desempenham um papel central ou relevante na modulação da resposta imune alérgica. Esses achados sugerem que a IgE, uma imunoglobulina amplamente reconhecida por sua participação nas reações alérgicas, pode ser o principal mediador da resposta alérgica nesses indivíduos.

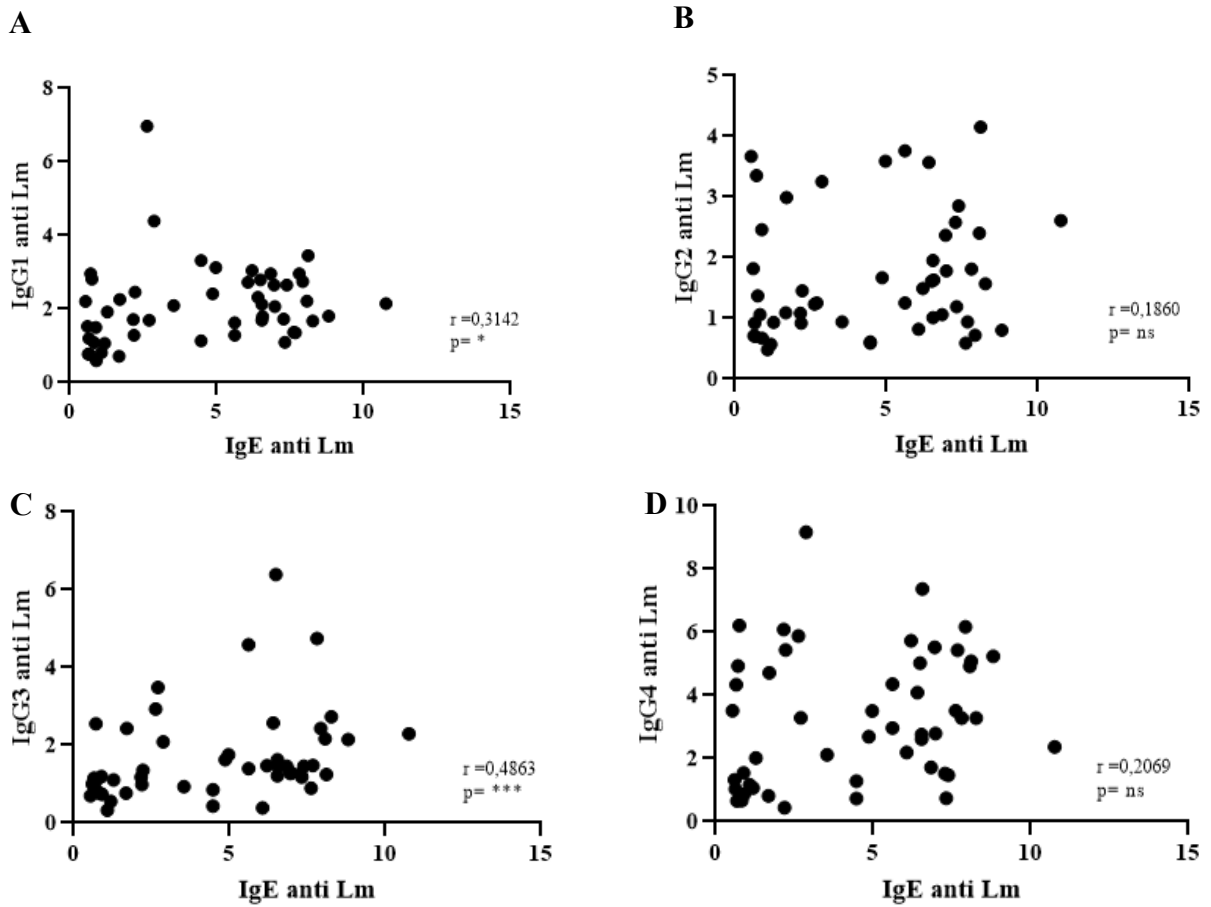


Figura 6. Correlação de IgE anti Lm com subclasses de anticorpos IgGs específicos para o extrato total de pólen de *L. multiflorum* em indivíduos atópicos e não atópicos, expressos em índice ELISA (A, B, C e D). Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

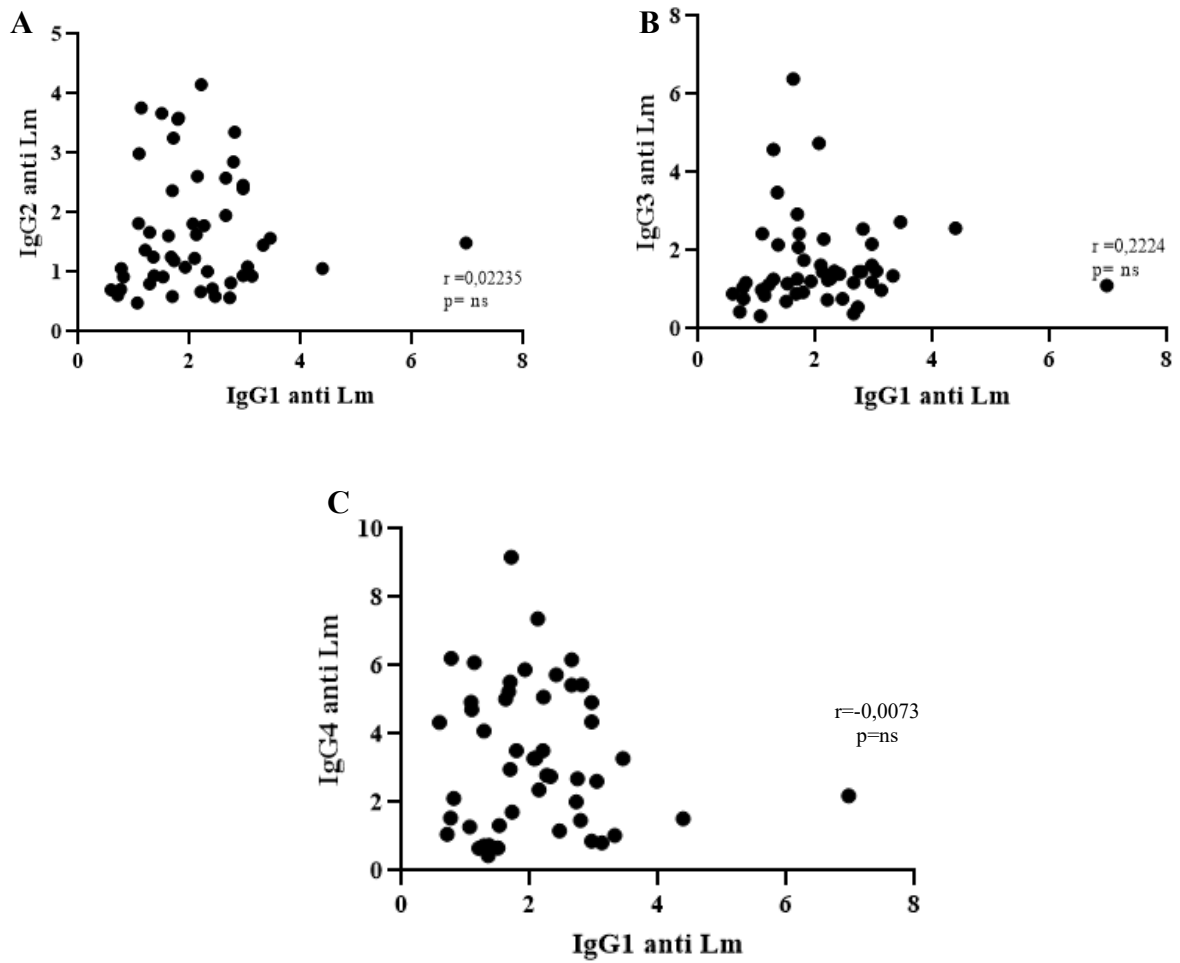


Figura 7. Correlação de IgG2 entre subclasses de IgG específicas para o extrato total de pólen de *L. multiflorum* em indivíduos atópicos e não atópicos, expressos em índice ELISA (A, B e C). Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

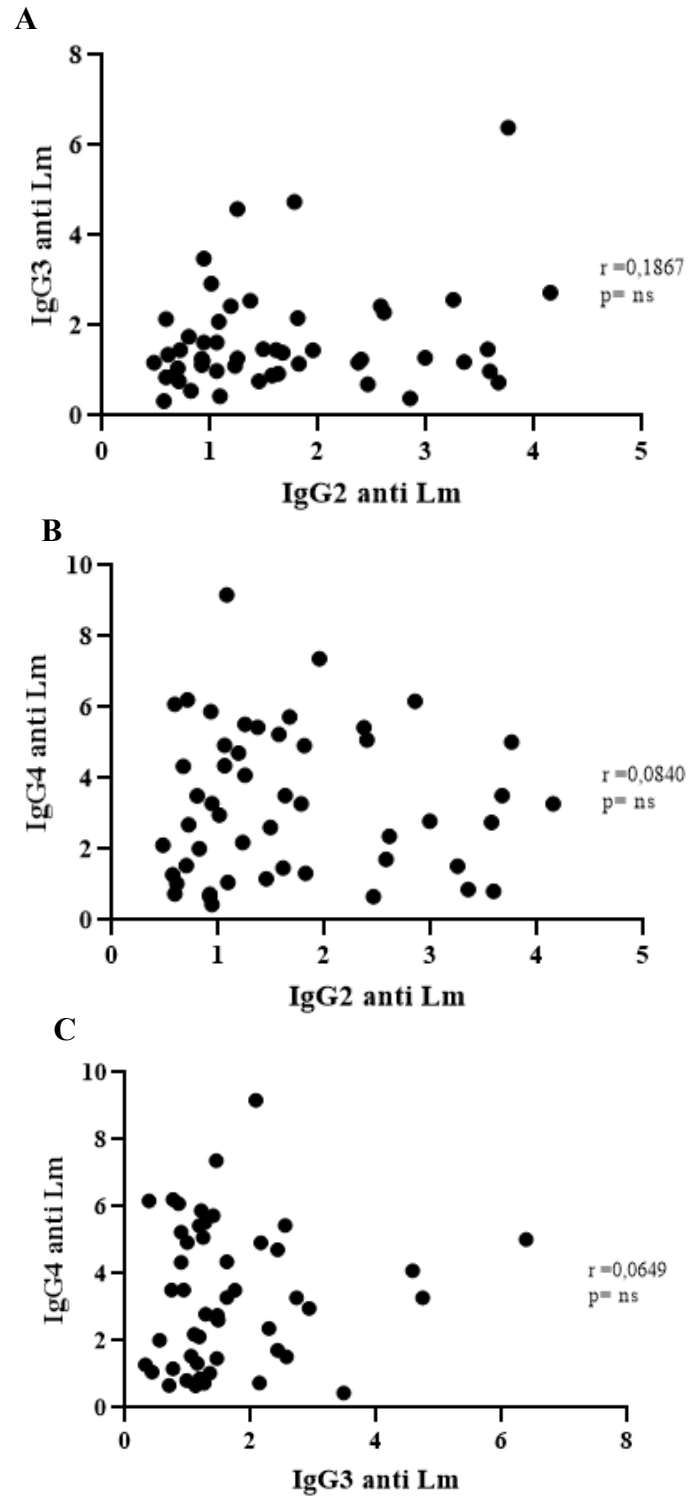


Figura 8. Correlação de IgG3 entre subclasses de IgGs específicas para o extrato total de pólen de *L. multiflorum* em indivíduos atópicos e não atópicos, expressos em índice ELISA (A, B e C). Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

As pesquisas recentes sobre alergia ao *Lolium multiflorum* são ainda limitadas, apesar de essa planta ser reconhecida como uma das principais fontes de alérgenos que causam rinite alérgica sazonal no sul do Brasil (BERNARDES et al., 2010). Portanto, é crucial aprofundar o conhecimento sobre a resposta imunológica provocada por essa gramínea, que tem causado sensibilização alérgica em muitas pessoas, levando ao desenvolvimento de doenças. Esse entendimento é essencial para criar ferramentas mais eficazes de diagnóstico, monitoramento e tratamento, utilizando extratos alergênicos provenientes de *L. multiflorum* (VIDARSSON, 2014).

Os pacientes foram classificados em dois grupos: atópicos (AT) e não atópicos (NAT), com base nos resultados do teste de ELISA para a dosagem de anticorpos IgE específicos ao extrato de pólenes de *L. multiflorum*. Como era esperado, a maioria dos indivíduos atópicos apresentou positividade no TCP em resposta ao extrato de *L. multiflorum*. No entanto, foi observado que uma pequena parte dos pacientes atópicos apresentou TCP negativo, o que pode ocorrer, mesmo que a literatura indique que a sensibilidade e a especificidade do teste possam variar conforme a concentração do alérgeno aplicado ao paciente (GODINHO et al., 2003; WAGNER; RUDERT, 2019; CORREA et al., 2023).

Estudos 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, exacerbando os sintomas (SOARES, 2007). A maioria dos pacientes com polinose submetidos ao teste cutâneo apresentou reações positivas ao extrato de *L. multiflorum*, atribuídas a altos níveis de anticorpos IgE específicos para este alérgeno, conforme confirmado pelo ELISA. No entanto, é importante notar que alguns pacientes atópicos apresentaram resultados negativos no teste de leitura imediata da pele. Isso pode ser explicado por variações na sensibilidade e especificidade do teste, influenciadas pela concentração do extrato alergênico utilizado (VIDARSSON et al., 2014). Essa diferença nos resultados sugere a necessidade de uma investigação mais detalhada, possivelmente relacionada à composição do extrato de pólen de *L. multiflorum*, que pode conter proteases. Estas proteases têm o potencial de ativar basófilos e mastócitos através de receptores específicos para proteases, conforme relatado por Corrêa et al. (2023) e outros estudos de Carvalho et al. (2009) e Siiskonen; Harvima et al. (2019).

Embora a IgE esteja presente em concentrações muito baixas no plasma, cerca de 100 ng/mL, ela desempenha um papel fundamental nas reações alérgicas e em condições atópicas como rinite alérgica, asma e dermatite atópica (ZHANG, 2021). A IgE é particularmente

relevante nos primeiros 60 minutos após a exposição a alérgenos. Apesar de sua meia-vida no sangue ser curta, cerca de um dia, quando a IgE se liga aos receptores de alta afinidade FcεRI em células como mastócitos, sua ação pode persistir por meses e desencadear respostas alérgicas, mesmo em relação a alérgenos sazonais. Pesquisas também demonstram que a presença de anticorpos IgE específicos para alérgenos aéreos, identificada através de testes cutâneos ou medição direta de IgE, está fortemente associada ao desenvolvimento de asma em crianças até os seis anos de idade. Isso sugere que a produção de IgE pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de doenças alérgicas em indivíduos atópicos (NELSON, 2014).

Corroborando, quando um alérgeno específico é aplicado na pele de indivíduos alérgicos usando um lancetador, os mastócitos dérmicos principalmente desgranulam devido à ligação cruzada dos anticorpos IgE específicos do alérgeno com seus receptores de membrana. Essa desgranulação leva à liberação imediata de histamina e outros mediadores, resultando em uma reação cutânea clinicamente observável conhecida como pápula (ANSOTEGUI, 2020).

O TCP é uma ferramenta essencial para determinar reações de hipersensibilidade imediata na pele e tem sido amplamente utilizado no diagnóstico de respostas alérgicas. O TCP permite a avaliação de respostas mediadas por IgE a alérgenos específicos, como o pólen de *L. multiflorum*, pela presença de pápulas na pele. Os resultados do presente estudo indicam que a correlação entre os níveis de anticorpos e a resposta do TCP pode fornecer insights importantes sobre os mecanismos imunológicos subjacentes. Confirmou-se uma forte correlação entre os níveis específicos de IgE e a reatividade cutânea medida pelo TCP, confirmando que a IgE desempenha um papel crucial na mediação da resposta alérgica imediata ao pólen de Lm.

Este estudo antecipou essa resposta em indivíduos alérgicos. Estudos têm mostrado correlações positivas entre os níveis de anticorpos IgE e IgG4, particularmente na sensibilização alérgica aos antígenos do pólen de *Lolium multiflorum* (ALMEIDA *et al.*, 2005; MOREIRA, *et al.*, 2015). Esses achados destacam o papel da IgG4 na manutenção da homeostase ao lado da IgG2.

Por outro lado, os níveis das subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) não mostraram uma correlação forte com o resultado do TCP. Neste estudo, a IgG3 mostrou uma correlação moderada ($r=0,3295$; $p=0,0222$), sugerindo uma interação possível, mas limitada, na resposta alérgica. A análise dos resultados de correlação de *Spearman* neste estudo (Figura 3) indica que, enquanto os níveis de IgE estão fortemente correlacionados com a reatividade do TCP, as subclasses de IgG não mostraram a mesma correlação (B: $r=0,1443$; $p=0,3278$; C: $r=-0,01537$; $p=0,9174$; E: $r=0,0480$; $p=0,7459$). Essa discrepância sugere que a resposta alérgica

mediada por IgE é independente dos níveis específicos de anticorpos IgG. Isso implica que medir IgE específica pode ser suficiente para prever a reatividade do TCP, enquanto avaliar as subclasses de IgG pode não fornecer informações adicionais úteis para determinar a sensibilização alérgica imediata (SOARES, 2007).

Correlações moderadamente baixas para IgG1, IgG2 e IgG3 indicam que essas subclasses de anticorpos também não desempenham um papel significativo na modulação da resposta alérgica mediada por IgE. Estudos anteriores sugerem que enquanto a IgG1 pode participar de respostas imunes gerais, a IgG2 está mais envolvida em respostas a polissacarídeos bacterianos, e a IgG3 está associada a respostas inflamatórias (GEHA *et al.*, 2003).

A importância de diferenciar as respostas imunológicas entre indivíduos atópicos e não atópicos para personalizar tratamentos alérgicos é apoiada por estudos sobre imunoterapia específica para alérgenos (ITE), que destacam a modulação da resposta imunológica por meio da IgG4 (AKDIS, M.; AKDIS, C. A.; 2014).

Como discutido anteriormente neste estudo, a avaliação dos níveis de IgG4 no soro tem sido proposta como um parâmetro objetivo para o monitoramento da Imunoterapia Específica (ITE) (TAKETOMI *et al.*, 2017). Sabe-se que a IgG4 compete com os anticorpos IgE específicos pelos locais de ligação nos receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI) presentes em mastócitos e basófilos, o que pode reduzir a degranulação de mediadores inflamatórios. No entanto, a eficácia da IgG4 na redução dos sintomas de rinite causada por pólen tem gerado controvérsias (GEHLHAR *et al.*, 1999; GÓMEZ *et al.*, 2015; SHAMJI *et al.*, 2017). Um estudo indicou que o aumento dos níveis de anticorpos IgG resultantes da ITE com alérgenos modificados leva a uma diminuição da sensibilidade da mucosa nasal aos alérgenos de pólen durante a estação de polinização (REISINGER *et al.*, 2005). Outra pesquisa recente mostrou que a IgG4 específica induzida pela ITE ao pólen está associada à produção de anticorpos locais (nasais) e funcionais, que inibem a ligação do complexo IgE-alérgeno aos receptores de baixa afinidade para IgE, CD23, nas células B da mucosa nasal (SHAMJI *et al.*, 2019). Assim, é evidente que os anticorpos IgG4 desempenham um papel regulador significativo na alergia a pólen de gramíneas.

Por fim, ao examinar o conteúdo proteico no extrato de pólen de *L. multiflorum*, foi realizada uma análise do perfil eletroforético das bandas do extrato bruto após a extração alérgica, permitindo a identificação de proteínas com diferentes pesos moleculares. Algumas dessas proteínas podem estar glicosiladas e apresentar alta atividade antigênica, interagindo com anticorpos IgE em indivíduos atópicos, e, portanto, desempenham um papel importante

nas respostas alérgicas (BERNARDES *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2015; CORREA *et al.*, 2023).

Na pesquisa de Correa *et al.* 2023, os autores identificaram que as bandas de 12, 32 e 58 kDa apresentaram a maior intensidade, com destaque especial para a banda de 32 kDa. Destacaram que de acordo com a literatura, as principais bandas com um peso molecular aproximado de 30 kDa em gramíneas são glicoproteínas contendo cerca de 5% de carboidratos, que têm a capacidade de se ligar a anticorpos da classe IgE em até 95% dos indivíduos alérgicos. Esses componentes pertencem ao grupo 1, incluindo as *β -expansinas*, que são reconhecidas como proteases relacionadas à papaína (GROBE *et al.*, 1999; JIN *et al.*, 2006; PACHARN *et al.*, 2019).

- Em síntese, os resultados deste estudo fornecem uma visão mais aprofundada sobre os níveis de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicos ao *Lolium multiflorum* em pacientes com polinose residentes no sul do Brasil. Embora as subclasses de IgGs não tenham mostrado correlação significativa com a reatividade cutânea observada no TCP, seu papel como moduladores imunológicos, particularmente a IgG4, tem grande relevância na imunoterapia específica para alérgenos como demonstra alguns estudos. Esses achados sugerem que a resposta alérgica mediada por IgE continua sendo o principal alvo para o tratamento dos sintomas imediatos, enquanto a IgG, especialmente a IgG4, pode ter um papel na modulação da resposta imunológica a longo prazo. Dessa forma, novas investigações são necessárias para esclarecer o impacto das subclasses de IgGs no desenvolvimento e controle da polinose. Compreender a distinção nas respostas imunológicas entre indivíduos atópicos e não atópicos é crucial para personalizar tratamentos alérgicos, especialmente na ITE, onde a modulação da resposta imunológica via IgG4 pode ter um impacto significativo.

6. CONCLUSÃO

- Os níveis de IgE demonstraram uma forte correlação com a reatividade do TCP, as subclasses de IgG mostraram uma correlação mais fraca ou nula;
- A resposta alérgica ao pólen de Lm dos indivíduos é mediada por IgE, operando de forma independente da IgG específica.
- Os níveis de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 entre os grupos AT e NAT, não demonstraram correlação entre si;
- As subclasses de IgG analisadas no estudo parecem exercer um papel comparável ao da IgG4 na regulação da inflamação alérgica, que é predominante na imunoterapia alérgica.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. A.; TAKETOMI, E. A.; GENNARI-CARDOSO, M. L. **Resposta de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 aos componentes ligantes de Concanavalina A isolados de *Blomia tropicalis* (Acari: Echimyopodidae) em indivíduos alérgicos e não alérgicos.** 2005. 81f. Dissertação mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.
- ANSOTEGUI, I. J.; MELIOLI, G.; CANONICA, G. W.; CARABALLO, L.; EBISAWA, M.; PASSALACQUA, G.; SAVI, E.; et al. IgE allergy diagnostics and Other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. **The World Allergy Organization Journal**, v. 13, n. 13, 2020. DOI: 10.1016/j.waojou.2019.100080.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- BOUSQUET J.; KHALTAEV N.; CRUZ A.A.; DENBURGO J.; FOKKENS WJ.; TOGIAS A.; et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen) **Allergy**, v.63, p. 160, 2008. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01620.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.
- 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.

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.

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.

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.

DESCOTES, J.; CHOQUET-KASTYLEVSKY, G. Gell and Coombs's classification: is it still valid?. **Toxicology**, v. 158, p. 43–49, 2001. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00400-5.

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.

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.

DYKEWICZ, M. D. M. S.; HAMILO, D. M. D. Rhinitis and sinusitis. **Journal of Allergy and clinical immunology**, v. 125, p. 103–115, n. 2, 2010. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.12.989

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.

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.

FALCON, R. M. G.; CAOILI, S. E. C. Immunologic, genetic, and ecological interplay of factors involved in allergic diseases. **Frontiers in Allergy**, v. 3, n.4, p. 1215616. DOI: 10.3389/falgy.2023.1215616.

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.

GEHA, R. S.; JABARA, H. H.; BRODEUR, S. R. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. **Nature Revista de Immunologia**, v. 3, p. 721-732, 2003. DOI: 10.1038/nri1181.

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.

GELL, P. G. H.; COOMBS, R. R. A. Classification of allergic reactions responsible for drug hypersensitivity reactions. In: Coombs, R.R.A., Gells, P.G.H. (Eds.), **Clinical Aspects of Immunology**, second ed. Davis, Philadelphia, PA, p. 575–596, 1968.

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.

GODINHO, R. et al. Frequência de positividade em teste cutâneo para aeroalérgenos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n.6, p. 824-828, 2003.

GOKSÖR, E.; LOID, P.; ALM, B.; ÅBERG, N.; WENNERGREN, G. The allergic march comprises the coexistence of related patterns of allergic disease and not just the progressive development of a disease. **Acta Paediatrica**, v. 105, n. 12, p. 1472-1479, 2016. DOI: 10.1111/apa.13515

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.

GREINER, A. N.; HELLINGS, P. W.; ROTIROTI, G.; SCADDING, G. K. Allergic rhinitis. **Lanceta**, v. 378, n. 9809, p. 2112–22, 2011. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60130-X.

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.

HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 193-204, 2008. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2010.02528.x.

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.

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>.

HUBER, B. 100 years of allergy: Clemens von Pirquet - his idea of allergy and its immanent concept of disease. **Viena Klin Wochenschr**, v.118, n. 19-20, p. 573-9, 2006. DOI: 10.1007/s00508-006-0701-3.

HUANG, J.; ZHANG, J.; WANG, X.; JIN, Z.; ZHANG, P.; SU, H.; SUN, X. Efecto de los probióticos en las enfermedades alérgicas del tracto respiratorio y la microbiota intestinal. **Kompass Neumologia**, v. 4, n. 2, p. 81-91, 2022. DOI: 10.1159/000525449.

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

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.

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.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

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.

LANGAN, S. M.; IRVINE, A. D.; WEIDINGER, S. Atopic dermatitis. **Lanceta**, v. 396, p.345–60, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31286-1.

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

LAUGHTER, M. R.; MAYMONE, M.B.C.; MASHAYEKHI, S.; ARENTS, B.W.M.; KARIMKHANI, C.; LANGAN, S.M.; DELLAVALLE, R.P.; FLOHR, C. The global burden of atopic dermatitis: lessons from the Global Burden of Disease Study 1990-2017. **British Journal of Dermatology**, v. 184, n. 2, p. 304–309, 2021. DOI: 10.1111/bjd.19580.

MARK, S.; MORAN, R.; PARR, T.; KENNERLEY, S. W.; BEHRENS, T. E. J. Transferring structural knowledge across cognitive maps in humans and models. **Nature Communications**, v. 11, p. 4783, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-18254-6.

- 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.
- 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.
- MONTSERRAT, A. L.; AKDIS, C. A.; AKDIS, M.; ALVIANI, C.; ANGIER, E.; ARASI, S.; ARZT-GRADWOHL, L.; VAZQUEZ-ORTIZ, M.; *et al.* (2020). EAACI Allergen Immunotherapy User's Guide. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 31(Suppl 25), p. 101. DOI: 10.1111/pai.13189.
- 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.
- 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.
- OBER, C.; YAO, T.-C. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. **Immunological Reviews**, v. 242, n. 1, p. 10-30, 2011. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01029.x.
- 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.
- 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.
- PIÑEIRO-HERMIDA, S.; MARTÍNEZ, P.; BLASCO, M. A. Short and dysfunctional telomeres protect from allergen-induced airway inflammation. **Aging Cell**, v.20, n. 5, p. 13352, 2021. DOI: 10.1111/acel.13352.
- QIN, L.; TANG, L. F.; CHENG, L.; WANG, H. Y. The clinical significance of allergen-specific IgG4 in allergic diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 1032909, 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1032909.
- RANKIN, C. T.; VERI, M.-C.; GORLATOV, S.; TUAILLON, N.; BURKE, S.; HUANG, L.; INZUNZA, H. D.; LI, H.; THOMAS, S.; JOHNSON, S.; STAVENHAGEN, J.; KOENIG, S.; BONVINI, E. CD32B, the human inhibitory Fc- γ receptor IIB, as a target for monoclonal

antibody therapy in B-cell lymphoma. **Blood**, v. 108, n. 7, p. 1049-1057, 2006. DOI: 10.1182/blood-2006-05-020602.

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.

RING, J. Terminology of allergic phenomena. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 100, p. 46–52, 2014. DOI: 10.1159/000358500.

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

SERPA, F. S.; ZANDONADE, E.; REIS, J. L.; BORJA, T. N.; *et al.* Prevalência de asma, rinite e eczema atópico em escolares do município de Vitória, Espírito Santo, Brasil. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 16, p. 107–114, 2015. DOI: 10.21722/rbps.v16i3.10144.

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.

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.

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.

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.

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

SMALL, P.; FRENKIEL, S.; BECKER, A.; BOISVERT, P.; BOUCHARD, J.; CARR, S.; COCKCROFT, D.; DENBURG, J.; DESROSIERS, M.; GALL, R.; HAMID, Q.; HÉBERT, J.; JAVER, A.; KEITH, P.; KIM, H.; LAVIGNE, F.; LEMIÈRE, C.; *et al.* Rhinitis: a practical

and comprehensive approach to assessment and therapy. **The Journal of Otolaryngology**, v. 36, 2007. DOI: 10.2310/7070.2006.X002.

SMALL, P.; KEITH, P. K.; KIM, H. Allergic rhinitis. **Allergy Asthma Clinical and Immunology**, v. 14, p. 51, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0280-7>.

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.

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.

VARGAS, L.; HENCKES, J. R.; SCMITZ, M. F.; PIASECKI, C.; CECHIN, J.; TORCHELSEN, J.; AGOSTINETTO, D. Caracterização e manejo de azevém (*Lolium multiflorum* L.) resistente a herbicidas em áreas agrícolas. **Plantio direto**, v. 28, n. 162, p. 15, 2018.

VIEIRA, F. A. M. Polinose no Brasil. In: NEGREIROS, E. B.; UNGIER, C. *Alergologia clínica*. São Paulo: **Atheneu**, p.106-11, 1995.

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.

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.

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.

WANG, J.; ZHOU, Y.; ZHANG, H.; *et al.* Pathogenesis of allergic diseases and implications for therapeutic interventions. **Signal Transduction and Target Therapy**, v. 8, n.1, p. 138, 2023. DOI: 10.1038/s41392-023-01344-4.

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.

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

8. ANEXOS

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. 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

Código: _____ **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