



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

“Reatividade anticórpica IgE, IgG1 e IgG4
específica a antígenos de pólen de
Lolium multiflorum (Lam. 1779)
em pacientes com polinose”

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

Priscila Ferreira de Sousa Moreira

Uberlândia
2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

“Reatividade anticórpica IgE, IgG1 e IgG4
específica a antígenos de pólen de
Lolium multiflorum (Lam. 1779)
em pacientes com polinose”

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

Priscila Ferreira de Sousa Moreira

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Uberlândia
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

M838r Moreira, Priscila Ferreira de Sousa, 1981-
 “Reatividade anticórpica IgE, IgG1 e IgG4 específica a antígenos de
 pólen de *Lolium multiflorum* (Lam. 1779) em pacientes com polinose” /
 Priscila Ferreira de Sousa Moreira. - Uberlândia, 2006.
 68f. : il.
 Orientador: Ernesto Akio Taketomi.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
 de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.
 1. Alergia - Teses. I. Taketomi, Ernesto Akio. II. Universidade Federal
 de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicadas. III. Título.

CDU: 616-056.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

Priscila Ferreira de Sousa Moreira

**“Reatividade anticórpica IgE, IgG1 e IgG4 específica a antígenos de pólen de
Lolium multiflorum (Lam. 1779) em pacientes com polinose”**

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

Área de concentração: Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

Banca Examinadora:

Uberlândia, 22 de fevereiro de 2006.

Prof. Dr. Dirceu Solé – UNIFESP

Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza – ICBIM/UFU

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi – ICBIM/UFU

DEDICATÓRIA

Dedico esse estudo especialmente a minha família que sempre esteve ao meu lado nos momentos decisivos da minha vida.

“Tudo neste mundo tem o seu tempo; cada coisa tem a sua ocasião. Há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de arrancar; tempo de matar e tempo de curar; tempo de derrubar e tempo de construir. Há tempo de ficar triste e tempo de se alegrar; tempo de chorar e tempo de dançar; tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntá-las; tempo de abraçar e tempo de afastar. Há tempo de procurar e tempo de perder; tempo de economizar e tempo de desperdiçar; tempo de rasgar e tempo de remendar; tempo de ficar calado e tempo de falar. Há tempo de amar e tempo de odiar; tempo de guerra e tempo de paz.”

Eclesiastes Cap 3, 1-14

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a Deus, por ter dado o presente da vida, uma família insubstituível e também pelas oportunidades que surgem ao longo da vida, tornando possível o alcance de nossos objetivos;

Aos meus pais, Samuel e Hiléia, e minhas irmãs Mariana e Daniela, pelo amor, carinho, compreensão, apoio e incentivos constantes;

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

À Deise, uma verdadeira mãe científica, sempre disposta em ajudar e ensinar todos nós, contribuindo para o enriquecimento de nossos trabalhos. Um ser humano verdadeiramente especial!

À minha grande amiga Mônica, pelo companheirismo, paciência, compreensão e ensinamentos durante todo este período e espero que por muito mais tempo;

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

Aos amigos do grupo de alergia: Ronaldo, Cristiane, Jorge, Sheilla, Caroline, Gesmar, Fabiola, Juliana, Fabiana e a todos que já passaram ou que estão chegando;

Aos grandes amigos Karine, Leandro, Rafael, Núbia e Camila, pessoas muito especiais em minha vida;

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

Às professoras Dra. Janethe e Dra. Margareth, pelas sugestões na banca de qualificação, contribuindo para o melhoramento do trabalho;

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. Hipersensibilidade e atopia	5
1.2. Alergia e resposta imune mediada por anticorpos IgE	6
1.3. Anticorpos IgG na resposta imune alérgica	8
1.4. Alérgenos	9
1.5. Pólen e alérgenos	10
1.6. Polinose	13
1.7. Polinose no Brasil e no mundo	16
1.8. Pólen alergênicos no Brasil	18
1.9. <i>Lolium multiflorum</i>	19
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Aspectos éticos	23
3.2. Local do estudo	23
3.3. Coleta de pólen de <i>L. multiflorum</i>	24
3.4. Extração antigênica	25
3.4.1. Extração em PBS	25
3.4.2. Extração em éter-PBS	26
3.4.3. Extração em bicarbonato de amônio (NH ₄ HCO ₃)	26
3.5. Dosagem protéica e dosagem de carboidratos	26
3.6. SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio	27
3.7. Preparação do extrato alergênico para teste cutâneo de punção	28
3.8. Termo de consentimento e avaliação clínica dos indivíduos do estudo	28
3.9. Teste cutâneo de punção	29
3.10. Seleção de pacientes com polinose e indivíduos controles	30
3.11. Coleta de sangue	31
3.12. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IgE sérica específica a alérgenos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i>	32
3.13. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IgG1 e IgG4 específicos a alérgenos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i>	34
3.14. Normas de biossegurança	35
3.15. Análise estatística	35

4 . RESULTADOS	37
4.1. Dados gerais dos pacientes e teste cutâneo de puntura	37
4.2. Análise eletroforética, conteúdo protéico e de carboidratos	39
de extratos de pólen de Lm	
4.3. IgE sérica específica aos extratos de Lm	41
4.4. IgE, IgG1 e IgG4 específicos a pólen de Lm	44
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8. ANEXOS	67
ANEXO 1	67
ANEXO 2	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	<i>2'2-azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid</i>
BSA	soroalbumina bovina
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
Bet v 1	alérgeno do grupo 1 de <i>Betula verrucosa</i>
°C	grau Celsius
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	centímetro
CNS	Conselho Nacional de Saúde
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
DO	densidade óptica
Dp	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
ELISA-IgE	ensaio imunoenzimático específico para detecção de anticorpos IgE
g	grama
<i>g</i>	força relativa da gravidade
HC-UFU	Hospital de Clínica da Universidade Federal de Uberlândia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	Índice ELISA
IgE	imunoglobulina E
IgG	imunoglobulina G
IgG1	imunoglobulina G de subclasse 1
IgG4	imunoglobulina G de subclasse 4
IL	interleucina
kDa	kilodaltons
Lam.	Lamarck
Lm	<i>Lolium multiflorum</i>
Lm _{PBS}	extrato bruto de pólen de Lm obtido pela extração em PBS
Lm _{e-PBS}	extrato bruto de pólen de Lm obtido pela extração em éter-PBS
Lm _{NH₄HCO₃}	extrato bruto de pólen de Lm obtido pela extração em NH ₄ HCO ₃
Lm+	grupo de pacientes com polinose e TCP positivo a extrato de Lm
Lm-	grupo de pacientes atópicos e TCP negativo a extrato de Lm e positivo a extratos de ácaros
Lm-CS	subgrupo de pacientes Lm- residentes em Caxias do Sul
Lm-Udi	subgrupo de pacientes Lm- residentes em Uberlândia
Lol p 1	alérgeno do grupo 1 de <i>Lolium perenne</i>
Lol p 5	alérgeno do grupo 5 de <i>Lolium perenne</i>
MG	Minas Gerais
mL	mililitro
mm	milímetros
µg	micrograma
NA	grupo de indivíduos não-atópicos

NaCl	cloreto de sódio
NH_4HCO_3	bicarbonato de amônio
nm	nanômetro
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 (<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i>)
RS	Rio Grande do Sul
r_s	Coeficiente de correlação de Spearman
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
TCP	teste cutâneo de puntura
Th2	linfócito T <i>helper</i> 2

RESUMO

Introdução: A rinite alérgica estacional ou doença polínica se deve à sensibilização aos alérgenos de pólen, geralmente de gramíneas. *Lolium multiflorum* (Lm) é uma gramínea com pólen de elevado potencial alergênico, sendo a principal gramínea causadora de polinose na região Sul do Brasil.

Objetivos: Analisar três diferentes métodos de extração antigênica pela reatividade IgE de cada extrato e as respostas anticórpicas IgE, IgG1 e IgG4 específicas aos antígenos de pólen de Lm.

Material e Métodos: Três extratos de pólen de Lm foram preparados (extratos Lm_{PBS}, Lm_{e-PBS} e Lm_{NH₄HCO₃}) e analisados por SDS-PAGE a 13,5%. Amostras de soro de 62 pacientes com rinite alérgica sazonal e/ou asma brônquica (grupo Lm+), 30 pacientes com rinite alérgica perene (grupo Lm-) e 30 indivíduos não-atópicos (grupo NA) foram testadas para a reatividade IgE frente aos três extratos por ELISA. Anticorpos IgG1 e IgG4 específicos a Lm foram avaliados empregando-se somente o extrato Lm_{PBS}, por ELISA.

Resultados: O perfil protéico dos extratos foi muito semelhante por SDS-PAGE, apresentando bandas protéicas de 20 a 100 kDa. Níveis de IgE foram maiores em pacientes com polinose ao se utilizar o extrato Lm_{PBS}. O extrato Lm_{PBS} foi utilizado para avaliar os níveis de IgE, IgG1 e IgG4, que foram maiores nos pacientes com polinose que em pacientes Lm- e indivíduos NA. No grupo Lm+, os níveis médios de IgE (IE = 17,6) foram maiores que os níveis de IgG1 (IE = 2,6) e IgG4 (IE = 3,6) ($p < 0,001$).

Conclusões: O extrato Lm_{PBS} foi eficiente em detectar as respostas IgE, IgG1 e IgG4 a antígenos de pólen de Lm. Essas classes de anticorpos estão em níveis maiores em pacientes com polinose. Extratos antigênicos de Lm para uso *in vivo* e *in vitro* devem ser padronizados.

Palavras-chave: pólen, polinose, *Lolium multiflorum*, extrato antigênico, IgE, IgG1, IgG4

SUMMARY

Background: Seasonal allergic rhinoconjunctivitis or hay fever is caused due to the sensitization to pollen allergens, usually from grasses. *Lolium multiflorum* (Lm) is one of the most important grass pollen allergens in Southern Brazil.

Objectives: To evaluate three different pollen extraction methods and to analyze IgE, IgG1 and IgG4 responses to Lm pollen antigens in pollinosis patients.

Methods: Three different Lm pollen extracts were prepared (Lm_{PBS} extract, Lm_{e-PBS} extract and Lm_{NH₄HCO₃} extract) and analyzed in 13.5% SDS-PAGE. Serum samples from 62 patients with seasonal allergic rhinoconjunctivitis and/or asthma (Lm+ group), 30 patients with perennial allergy rhinitis (Lm- group) and 30 non-atopic subjects (NA) were tested for IgE reactivity to three Lm extracts by ELISA. Lm-specific IgG1 and IgG4 antibodies were also evaluated by using Lm_{PBS} extract only in ELISA.

Results: By SDS-PAGE, the three extracts were very similar, showing bands ranging from 20 to 100 kDa. By ELISA-IgE, the results revealed higher IgE levels in pollinosis patients when Lm_{PBS} extract was used. Lm_{PBS} extract was chosen to evaluate the IgE, IgG1 and IgG4 responses and their levels were higher in the Lm+ patients when compared to Lm- and NA groups. In the Lm+ group, IgE (EI = 17.6) levels were higher than IgG1 (EI = 2.6) and IgG4 (EI = 3.6) levels, while in other groups there were not any differences in the antibody levels.

Conclusions: Lm_{PBS} extract was effective in detecting IgE, IgG1 and IgG4 responses to *Lolium multiflorum* pollen antigens. These antibody classes are in a higher level in pollinosis patients when compared to non-sensitized subjects. Lm allergen extracts for *in vivo* and *in vitro* using should be standardized.

Key Words: pollen, pollinosis, *Lolium multiflorum*, allergen extract, IgE, IgG1, IgG4

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipersensibilidade e Atopia

As doenças de hipersensibilidade são causadas quando há um distúrbio na resposta imune, sendo classificadas de acordo com o tipo da resposta imune e do mecanismo efetor responsável pela lesão da célula e do tecido. Gell e Coombs (1968) propuseram a primeira classificação das doenças de hipersensibilidade: hipersensibilidade do tipo I, II, III e IV. Essa classificação tem sido adotada até os dias atuais, porém Johansson et al. (2001) sugeriram uma nova classificação, onde definem a hipersensibilidade como sintomas ou sinais iniciados pela exposição a um estímulo definido em uma dose tolerada por indivíduos normais, classificando-a em hipersensibilidade alérgica, quando o mecanismo imunológico é definido ou fortemente suspeito, e em não alérgica, quando o mecanismo imunológico não pode ser comprovado. Dentro desse contexto, a alergia é definida como uma reação de hipersensibilidade iniciada por mecanismos imunológicos, podendo ser mediada por células ou por anticorpos. Na maioria dos pacientes, o principal anticorpo responsável pela reação alérgica é o isotipo IgE - alergia IgE-mediada. Na reação alérgica que não é mediada por anticorpos IgE, os principais anticorpos responsáveis pela alergia são os da classe IgG. Quando a alergia é mediada por células, como na dermatite de contato, os linfócitos T apresentam papel importante no desencadeamento da resposta alérgica (JOHANSSON et al., 2001).

As doenças alérgicas são o resultado de complexas interações entre mecanismos ambientais e genéticos (COOKSON, 1999). Indivíduos predispostos

geneticamente a produzir anticorpos IgE em resposta a baixas doses de alérgenos, geralmente proteínas, e que desenvolvem sintomas como asma, rinoconjuntivite ou dermatite atópica, são considerados indivíduos atópicos (JOHANSSON et al., 2001).

A palavra atopia foi empregada primeiramente por Coca e Cooke em 1923, sendo utilizada para descrever as apresentações clínicas da hipersensibilidade tipo I, incluindo a asma, o eczema atópico, a febre do feno, a urticária e a alergia a alimentos (COCA; COOKE, 1923 apud JOHANSSON et al., 2001). Tais manifestações ocorrem em pacientes com história familiar de sintomas semelhantes e que apresentam uma reação cutânea de pápula e eritema aos alérgenos ambientais comuns. Existe nítida predisposição genética para o desenvolvimento de doenças alérgicas, por exemplo, o risco de uma criança desenvolver alergia mediada por IgE é de 40 – 60% caso ambos os pais sejam atópicos. Já em crianças com ambos os pais não atópicos esse risco seria de 5 – 10% (JOHANSSON et al., 2001).

O estado atópico é reconhecido por teste cutâneo, no qual ocorre a degranulação dos mastócitos caso a IgE específica ao alérgeno esteja presente, provocando uma reação local visível; pela presença de IgE alérgeno-específica no soro, pela elevação da IgE sérica total e pela presença de eosinófilos no sangue (COOKSON, 1999).

1.2. Alergia e resposta imune mediada por anticorpos IgE

A alergia é um dos principais problemas de saúde da maioria das sociedades modernas. Há um certo consenso de que a prevalência de determinadas doenças

alérgicas tem aumentado na maioria dos países industrializados durante as últimas décadas (RING et al., 2001).

As alergias são causadas pela reação imune a proteínas, conhecidas como alérgenos, sendo que as principais fontes de alérgenos incluem ácaros da poeira domiciliar, pólenes de gramíneas e pêlos de animais. Os alérgenos causam doença devido à intensidade da reação imune que eles provocam, e tal reação é marcada por resposta de anticorpos IgE (COOKSON, 1999).

O sistema imune possui um mecanismo de atuação poderoso que é a estimulação dos mastócitos e basófilos mediada por anticorpos IgE. Quando associados a essas células, esses anticorpos se ligam aos antígenos ativando as células a liberarem uma variedade de mediadores. A ação desses mediadores causa coletivamente aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, edema e contração dos músculos lisos, sendo tais fenômenos responsáveis pelas manifestações clínicas preliminares das reações de hipersensibilidade do tipo I ou imediata. (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

Indivíduos alérgicos apresentam uma resposta de células T do tipo CD4+ alérgeno-específicas produtoras de citocinas do perfil Th2 (linfócito T *helper* 2), como as interleucinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL 13, que têm papel importante no desencadeamento e progressão das doenças alérgicas, além de promover, manter e amplificar a síntese de anticorpos IgE. Além disso, a IL-4 leva à mudança de classe de anticorpos pelas células B alérgeno-estimuladas, e a IL-5 tem papel importante na maturação e ativação de eosinófilos (ROMAGNANI, 1997; HERRICK; BOTTOMLY, 2003).

A determinação de anticorpos IgE específicos no soro e também por teste cutâneo de punção é comumente usada para diagnosticar doenças alérgicas atópicas e, especialmente, mediadas por IgE. Ambas as técnicas tem sido utilizadas para avaliar a frequência de sensibilização alérgica na população (SCHÄFER et al., 2003).

1.3. Anticorpos IgG na resposta imune alérgica

Enquanto a elevação dos níveis de IgE, em resposta a alérgenos ambientais é uma característica distintiva da atopia, anticorpos IgG alérgeno-específicos a esses mesmos alérgenos são detectados no soro, tanto de indivíduos atópicos, quanto de indivíduos não atópicos, com distribuição diferente nos dois grupos (KENEMY et al., 1989).

As principais subclasses de anticorpos IgG alérgeno-específicos são relatadas como sendo IgG1 e IgG4, e a predominância de uma ou outra subclasse depende do grau de exposição ao alérgeno (DEVEY; WILSON; WHEELER, 1976; DJURUP; OSTERBALLE, 1984).

Kenemy et al. (1989) ao avaliarem a resposta imune normal, com relação às subclasses de anticorpos IgG a alérgenos inalados, constataram que indivíduos atópicos apresentavam maiores níveis de anticorpos IgG4, em resposta tanto à exposição a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar, quanto aos alérgenos de pólenes de gramíneas, diferindo assim de indivíduos não atópicos, que apresentavam baixos níveis de anticorpos IgG4.

Em recentes estudos, ao se investigar a relação entre níveis de exposição a alérgenos de gato e cachorro e o desenvolvimento de asma, foi demonstrado um

progressivo aumento nos títulos de IgG sérica específica com a exposição prolongada, sendo mais prevalentes anticorpos do isotipo IgG4 dependente de citocinas do perfil Th2 (PLATTS-MILLS et al., 2001; PERZANOWSKI et al., 2002)

Anticorpos IgG têm sido considerados bloqueadores da resposta alérgica (DEVEY; WILSON; WHEELER, 1976). Eles estão presentes durante a imunoterapia, sendo responsáveis pelo efeito benéfico do tratamento (AALBERSE; VAN DER GAAG; VAN LEEUWEN, 1983). Quando há exposição prolongada, como nos casos de imunoterapia, há o desenvolvimento de anticorpos IgG4, o qual é monitorado durante o tratamento (VAN DER GIESSEN et al., 1976; AALBERSE et al., 1993). Dessa forma, para atingir a inibição da reação alérgica a quantidade de anticorpos IgG alérgeno-específicos, comparada com a quantidade de IgE alérgeno-específica é de interesse, sendo importante a razão molar IgE/IgG (WITTEMAN et al., 1996).

Anticorpos IgE e IgG são freqüentemente direcionados a epítomos distintos (AALBERSE et al., 1998). Além disso, tanto a distribuição das subclasses de anticorpos IgG quanto a afinidade desses anticorpos dependem da natureza do alérgeno sensibilizante (BOLUDA; LA CUADRA; BERRENS, 1996).

1.4. Alérgenos

Alérgenos são substâncias capazes de desencadear uma resposta imunológica com a produção de imunoglobulinas da classe IgE. Eles podem ser proteínas e glicoproteínas e são provenientes de várias fontes ambientais. Os alérgenos inaláveis são responsáveis pela indução de alergias respiratórias (por exemplo, asma e rinoconjuntivite) e podem contribuir para a exacerbação da

dermatite atópica (ABBAS; LICHTMAN, 2003; DUTRA; ROSÁRIO-FILHO; ZAVADNIAK, 2001).

O contato inicial do alérgeno com a mucosa leva à produção de IgE, sendo a resposta de IgE um evento local, que ocorre no sítio de entrada do alérgeno no organismo, isto é, em superfícies mucosas e/ou em linfonodos locais (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999). Como foi dito anteriormente, os alérgenos causam doença devido à intensidade de reação imune que eles provocam, a qual é mediada pelos anticorpos IgE específicos para os alérgenos (COOKSON, 1999).

Os principais alérgenos inaláveis encontrados no nosso meio são oriundos de: ácaros da poeira domiciliar, como do gênero *Dermatophagoides*, pólen, fungos do ar, baratas e epitélio de animais (RING et al., 2001). No caso, os antígenos de pólen podem provocar a polinose (febre do feno ou *hay fever*) ou rinoconjuntivite alérgica quando em contato com a mucosa do aparelho respiratório e da conjuntiva de indivíduos previamente sensibilizados (DUTRA; ROSÁRIO-FILHO; ZAVADNIAK, 2001).

1.5. Pólen e alérgenos

O grão de pólen (gametófito masculino) é uma estrutura especializada que alberga os gametas masculinos das plantas com flores, consistindo de uma parte do ciclo de vida dessas plantas. Sua função biológica é fecundar o gametófito feminino. Na natureza, os pólenes ocorrem em vários formatos e apresentam uma parede mais externa, ou exina, constituída por esporopolenina, é importante na resistência física e química do grão de pólen; e uma parede interna, ou intina, que circunda o citoplasma do pólen, sendo que esse contém todas as organelas

intracelulares, incluindo os núcleos vegetativo e germinativo, bem como grânulos de amido e partículas de polissacarídeos reduzidas (KNOX, 1979).

Os grãos de pólen dispersos ou transportados pelo ar, ou seja, anemófilos, são os de importância alergológica. Um grão de pólen pode ser transportado por 175 km a uma velocidade média de 10 m/segundo. Eles sedimentam-se em ar sem movimentação em aproximadamente 3,1 cm/segundo (STANLEY; LINSKENS, 1974).

O pólen permanece estável por séculos em uma atmosfera seca. Alérgenos de grãos de pólen secos ou desidratados mostraram pouca atividade na matriz citoplasmática, mas forte atividade em organelas como mitocôndria, partículas de polissacarídeos e grãos de amido (STANLEY; LINSKENS, 1974).

Alérgenos de pólen são proteínas ou glicoproteínas extremamente solúveis em água, sendo capazes de evocar uma reação alérgica mediada por IgE dentro de segundos, o que torna seus alérgenos biologicamente e prontamente disponíveis (BEHRENDT; BECKER, 2001).

Partículas alergênicas são liberadas do citoplasma do pólen, por expulsão, por pelo menos dois mecanismos. Primeiro, o grão de pólen em contato direto com a mucosa em meio isotônico, levaria à difusão rápida dos alérgenos, os quais induziriam sintomas alérgicos imediatos nas superfícies mucosas acessíveis, como por exemplo, conjuntiva e mucosa nasal (VRTALA et al., 1993). De acordo com o segundo mecanismo proposto, a rápida expulsão de materiais respiráveis dos grãos de pólen, contendo alérgenos permitiria sua hidratação em meios hipotônicos (como água da chuva), que devido seu reduzido tamanho alcançaria as vias aéreas inferiores e induziria sintomas de asma (SUPHIOGLU, 1998).

Assim, a liberação de alérgenos dos grãos de pólen pode ocorrer em dois diferentes compartimentos: na superfície da mucosa do trato respiratório superior após exposição ao pólen; e no ar ambiente, ou seja, no lado externo do organismo animal/humano. Diferente dos alérgenos dos ácaros da poeira domiciliar, o risco de sensibilização a alérgenos ambientais, como os de pólen, não pode ainda ser adequadamente estimado pela sua simples contagem no ambiente (MONN; KOREN, 1999).

A liberação dos alérgenos de dentro do grão de pólen é um pré-requisito para sua atuação em indivíduos sensibilizados. Existem pelo menos três mecanismos indutores da liberação de alérgenos de pólen: alta umidade relativa do ar; tempestades e chuvas pesadas e poluentes atmosféricos. Sobre condições de umidade, os alérgenos são liberados dos grãos de pólen em um processo que ocorre sobre condições fisiológicas de polinização (BEHRENDT et al., 1997).

Um estudo realizado com a gramínea *Phleum pratense* (*timothy grass*, ou grama timóteo) confirmou a presença de grânulos de amido carreadores de alérgenos, os quais eram liberados após contato com a água. Esses grânulos foram reconhecidos pelo soro de ratos sensibilizados ao pólen, e eram responsáveis por desencadear a proliferação de linfócitos nesses ratos. Esses dados evidenciaram a implicação de grânulos de amido de pólen de gramíneas na asma alérgica (MOTTA et al., 2004).

Grãos de pólen não liberam somente alérgenos sob condições de umidade. Recentemente, Behrendt et al. (2001) demonstraram que grãos de pólen são capazes de secretar significativa quantidade de substâncias semelhantes a eicosanóides (substâncias que reagiram cruzadamente com leucotrieno B₄ e

prostaglandina E2 em ensaio imunoenzimático) de uma maneira dependente de pH, tempo e temperatura.

Os grãos de pólen liberam uma variedade de enzimas quando hidratados, incluindo proteases (WIDMER et al., 2000). Estas proteases podem ser biologicamente importantes, sendo capazes de causar dano epitelial e não serem inibidas por antiproteases endógenas (HASSIM; MARONESE; KUMAR, 1998). A liberação de proteases pode promover o rompimento das junções epiteliais, facilitando o transporte de proteínas, as quais podem promover sensibilização como resultado do aumento do acesso dos alérgenos às células dendríticas subepiteliais apresentadoras de antígenos (HOLT, 1993; ROBINSON et al., 1997).

1.6. Polinose

A rinite alérgica estacional (*hay fever*) ou doença polínica, ou febre do feno se deve à sensibilização aos alérgenos de pólen, geralmente de gramíneas, cuja presença no ar ocorre na época da polinização de determinadas plantas (ROSÁRIO-FILHO, 1987). O termo febre do feno trata-se de um simbolismo, uma vez que, na maioria das vezes, não existe feno e a febre é inexistente (ESTEVES et al., 1999).

A confirmação da associação dos pólenes como desencadeadores da polinose é creditada a Charles Blackley que em 1873 introduziu os testes cutâneos e de provocação, confirmando a etiologia da doença (BLACKLEY, 1873 apud MITMAN, 2004).

Uma característica importante da polinose é a periodicidade anual, sendo que os sintomas geralmente ocorrem na mesma época do ano durante a

polinização (VIEIRA, 2003). A polinose é clinicamente caracterizada por rinoconjuntivite e/ou asma brônquica. Os pacientes manifestam sintomas como prurido ocular com hiperemia conjuntival, coriza, espirros, prurido nasal ou faringo-palatal e ausência ou presença de obstrução nasal. Hiperreatividade brônquica com asma associada pode acontecer em 15 a 20% dos indivíduos. A hiperemia conjuntival e o prurido ocular são quase uma constante na polinose que diferenciam-na do resfriado comum (VIEIRA, 1995).

A sensibilização a alérgenos de pólenes pode ocorrer de forma isolada ou associada à sensibilização a outros alérgenos perenes, como os alérgenos de ácaros da poeira domiciliar do gênero *Dermatophagoides*, fungos e epitélio de animais. Desta forma, a sintomatologia pode ocorrer exclusivamente durante a primavera, época da polinização, ou durante todo o ano, porém nesse último caso, exacerbada na primavera. Geralmente, no Brasil, a sintomatologia inicia-se em setembro, exacerba-se intensamente nos meses de outubro e novembro, prolongando-se em alguns casos, até dezembro/janeiro (VIEIRA, 1995).

Na polinose a profilaxia é particularmente difícil, uma vez que os indivíduos têm a necessidade de permanecer no meio ambiente exterior, em suas atividades de trabalho e lazer. Nos dias em que a quantidade e a propagação de pólenes na atmosfera tornam-se significativas como nos dias mais secos, quentes e ventosos é indicado aos pacientes permanecer em ambiente fechado, se possível com ar condicionado e filtro. Uso de óculos pode reduzir o impacto de pólenes com as mucosas e, principalmente quando do uso de moto ou bicicleta, assim como em automóveis manter as janelas fechadas. Passeios em clubes de campo, cortar grama, ou trabalhos de jardinagem também devem ser evitados (VIEIRA, 1995).

A repetição por mais de uma estação polínica dos sintomas clássicos de rinoconjuntivite, associados ou não à asma brônquica, pressupõe o diagnóstico clínico de polinose. O uso inicial de teste intradérmico pode expor os pacientes a doses de alérgenos muito elevadas aumentando a possibilidade de reação causada por superdosagem, especialmente naqueles com asma brônquica. A utilização de extrato misto contendo pólenes de diferentes espécies de gramíneas é recomendada, uma vez que ocorre identidade alergênica ou reações cruzadas entre as mesmas. Testes de provocação nasal ou brônquica com antígenos polínicos e dosagem de IgE específica são métodos auxiliares de diagnóstico (VIEIRA, 1995).

O diagnóstico de alergia a pólen de gramíneas pode ser simplificado trocando mistura de gramíneas por espécies individualizadas e, mesmo por alguns alérgenos purificados. Alérgenos purificados de grupo 1 e 5 são responsáveis por mais de 90% de todos os soros com resultados positivos a pólen de gramíneas e, aproximadamente 80% de todas as IgE anti-pólen de gramíneas (VAN REE et al., 1998).

Extratos brutos são freqüentemente usados no diagnóstico, através de testes cutâneos e imunoterapia (ARILA et al., 2001; ROSÁRIO-FILHO, 1987; FAHLBUSCH et al., 1998), embora sua potência alergênica possa variar devido, no caso de pólenes, às condições ambientais de cultivo da plantas, além disso, estes extratos de ocorrência natural contêm uma mistura complexa de proteínas das quais somente algumas têm atividade alergênica (ARILA et al., 2001). Assim, faz-se necessária a quantificação dos principais alérgenos contidos nos extratos, com o objetivo de otimizar a imunoterapia específica, uma vez que baixas doses

são usualmente ineficientes e altas doses podem induzir a uma inaceitável taxa de reações sistêmicas (BOUSQUET; LOCKEY; MALLING, 1998).

1.7. Polinose no Brasil e no mundo

No Brasil, a primeira publicação a respeito da polinose, data de 1908, onde o autor, Dr. A. Carini, em São Paulo, questiona e indaga a existência de febre do feno no Brasil (CARINI, 1908 apud VIEIRA, 1995). Vários fatores podem ter sido responsáveis pelo aparecimento da polinose no Brasil, entre os quais a introdução de gramíneas com pólen de elevado potencial alergênico, associada ao desmatamento, à exploração da terra e ao aumento da população, em áreas com estações climáticas bem definidas (VIEIRA, 2003).

Lima e colaboradores, em um dos primeiros inquéritos epidemiológicos brasileiros, detectaram sensibilidade cutânea ao pólen de gramínea em 0,5% de 2.890 casos de alergia respiratória (LIMA et al., 1946 apud VIEIRA, 1995), enquanto que, Mendes e colaboradores em 1958 observaram reações moderadas a pólen em 10,4% de 186 pacientes alérgicos, em São Paulo, não sendo encontrados casos de sensibilização unicamente a pólen. Assim, os autores concluíram que existia polinose no Brasil e que de forma inaparente era encoberta por outras sensibilizações capazes de alterar seu quadro clínico característico (MENDES et al., 1985 apud VIEIRA, 1995).

Em estudo sobre polinose, foi verificado que o pólen de gramíneas contribuía para a sensibilização de 99% dos pacientes com polinose, associado ou não aos pressupostos alérgenos da flora regional do Sul do país (VIEIRA; NEGREIROS, 1989). Kurtz (1998) observou em Passo Fundo, RS, que a maioria dos casos de

rinite e conjuntivite, com ou sem asma sazonal, ocorreu nos meses de outubro a novembro, com menor frequência nos meses de janeiro e julho.

Uma recente pesquisa epidemiológica com estudantes universitários usando o questionário ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) mostrou que a frequência de sintomas associados à resposta afirmativa à alergia a pólen na primavera permitiu estabelecer uma prevalência de polinose de 14,1% em Caxias do Sul e de 22,1% em Santo Ângelo (VIEIRA; FERREIRA; MATTER, 2005).

Pólen de gramíneas é a principal origem de alérgenos ambientais em climas temperados e frios, sendo seu papel extensivamente conhecido e documentado. No Sul da Austrália e outras regiões de clima temperado o pólen da gramínea clinicamente mais importante na polinose é o pólen de *Lolium perenne*, citado na língua inglesa como *ryegrass* (KNOX; SUPHIOGLU, 1996). Espécies como *Poa pratensis* (grama azul) e *Phleum pratense* (grama timóteo), dentre outras, também podem ser consideradas clinicamente importantes dependendo da região geográfica (BASS et al., 2000; DAVIES et al., 2005).

Gramíneas diferentes podem conter epítomos de pólen compartilhados e seus principais alérgenos apresentam similaridades imunoquímicas, o que pode resultar em reatividade cruzada entre os alérgenos de espécies distintas de gramíneas (LOVBORG et al., 1999; FAHLBUSCH et al., 1998). Além disso, resíduos de carboidratos presentes em glicoproteínas de plantas, conhecidos como determinantes de carboidratos com reatividade cruzada, podem desencadear a síntese de IgE com ausência de atividade biológica, dificultando o diagnóstico sorológico das doenças alérgicas (EBO et al., 2004).

1.8. Pólens alergênicos no Brasil

Uma planta para ser considerada causadora de polinose deve ser anemófila, ou seja, espécie que apresenta dispersão de pólen através dos ventos, possuir pólen alergênico, ser abundante e estar próxima do homem (VIEIRA, 2002).

No Brasil, o pólen de gramíneas contribui com quase a totalidade dos casos de doença polínica, sendo que alérgenos de pólen de árvores e ervas teriam menor importância na sensibilização e indução de polinose em indivíduos atópicos, quando comparado com gramíneas (VIEIRA, 2003). Espécies de árvores da flora da região Sul do Brasil como *Platanus* sp, *Ligustrum* sp, *Acácia* sp, *Araucaria* e *Eucaliptus* distribuem ao seu redor grande quantidade de pólen fortemente alergizante (VIEIRA, 2003). Nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul encontra-se a polinose, onde nas últimas décadas as gramíneas substituíram a vegetação natural em grandes extensões (VIEIRA, 2002).

Outras espécies de gramíneas alergênicas crescem desordenadamente nas periferias das cidades e em terrenos abandonados como *Anthoxantum odoratum* (grama doce), *Cynodon dactylon* (graminha), *Holcus lanatus* (capim lanudo), *Paspalum notatum* (grama forquilha) e *Bromus*, entre outras (KURTZ, 1998; VIEIRA, 2003).

1.9. *Lolium multiflorum*

A espécie produtora de grãos de pólen evidenciada nesse trabalho, o *L. multiflorum*, apresenta a seguinte classificação taxonômica resumida:

Reino: Viridiplantae

Filo: Embryophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Poales

Família: Poaceae

Gênero: *Lolium*

Espécie: *Lolium multiflorum* (Lam. 1779)

No nosso meio, o *Lolium multiflorum*, conhecido popularmente como azevém, citado na língua inglesa como *italian ryegrass*, é uma gramínea com elevado potencial alergênico, sendo a principal gramínea causadora de polinose. Trata-se de uma forragem de inverno, não nativa, que foi trazida ao Brasil por imigrantes europeus para ser usada na agricultura. Sob o ponto de vista ecológico propaga-se e cresce desordenadamente (DUTRA; ROSÁRIO-FILHO; ZAVADNIAK, 2001; VIEIRA, 2002). Sendo uma gramínea invasora, cresce desordenadamente em áreas não agrícolas, tais como, ao longo de rodovias, ferrovias, linhas de transmissão, terrenos abandonados nas cidades e até mesmo nas calçadas e ruas. Desta forma, mesmo cidades densamente povoadas podem apresentar grãos de pólen de azevém, transportados pelo vento na época de polinização (VIEIRA, 2003).

O cultivo desta gramínea pode ser observado principalmente na região Sul, onde o *L. multiflorum* ocorre em associações com leguminosas de estação fria e outras culturas de verão, como a soja, constituindo uma fonte de renda para o produtor nesses períodos (VIEIRA, 2003).

Por possuir características de excelente adaptação às condições ambientais e ter alto valor nutritivo o *L. multiflorum* difundiu-se pelas regiões temperadas e subtropicais e foi introduzido como forrageira para os meses de inverno nos estados do Sul do Brasil. Estima-se que um hectare (100 x 100 metros) de cultivo de *L. multiflorum* possa produzir 100 kg de pólen, e que um grama deste pólen contenha 100 milhões de grãos, e que pacientes sensibilizados, altamente atópicos, podem apresentar sintomas com somente 5-10 grãos/m³ de ar (VIEIRA, 2003).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos demonstrando a associação dos alérgenos de pólen com doença atópica, principalmente, quanto aos alérgenos de gramíneas (BURTON et al., 2002; DAVIES et al., 2005). Grãos de pólen de *Lolium perenne*, uma gramínea do mesmo gênero que *L. multiflorum*, já foram associados à rinoconjuntivite alérgica sazonal, ou polinose em países de clima temperado e seus principais alérgenos já foram imunocitoquimicamente caracterizados e localizados ao nível de microscopia eletrônica de transmissão (GROTE et al., 2001; PEREZ et al., 1990).

Entretanto, no Brasil, não se conhece exatamente a extensão da polinose a alérgenos de grãos de pólen de gramíneas, uma vez que a polinose nas últimas décadas era considerada rara ou mesmo inexistente, sendo que recentemente, tem sido demonstrado que *L. multiflorum* é a principal gramínea causadora de

polinose na região Sul de nosso país (DUTRA; ROSÁRIO-FILHO; ZAVADNIAK, 2001). Devido à sua presença em nosso país e principalmente à sua importância como desencadeador de sintomas alérgicos relacionados a polinose, o *L. multiflorum* tem se mostrado adequado para estudos de sensibilização alérgica a gramíneas.

Na literatura científica, com relação à extração de alérgenos de pólen, tem-se encontrado várias metodologias e diluentes diferentes para a extração. Por exemplo, Fahlbusch et al. (1998) utilizaram bicarbonato de amônio para extrair alérgenos de pólen de gramíneas. Já em outro estudo, Carnés et al. (2002) testou três diluentes diferentes – água deionizada, PBS e NaCl – para avaliar a liberação de alérgenos de pólen de oliveira (*Olea europea*). Diante dessas diferenças de metodologias, torna-se importante a avaliação de uma forma adequada para extração alérgica de grãos de pólen.

Dessa forma, a análise da resposta de anticorpos específicos a alérgenos de pólen de *L. multiflorum* e a avaliação de diferentes métodos de extração se tornam relevantes. Além disso, pesquisas com essa espécie de gramínea são escassas e este estudo será importante, visto que novas informações e resultados serão acrescentados à comunidade científica.

2. OBJETIVOS

- Obter extratos antigênicos de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm) a partir de três diferentes métodos de extração;
- Determinar e avaliar a sensibilização alérgica ao pólen de *L. multiflorum* em pacientes atópicos, por meio de teste cutâneo de puntura e da determinação dos níveis séricos de IgE específica aos alérgenos de pólen de *L. multiflorum* por ELISA-IgE.
- Determinar e avaliar os níveis de IgE específica aos alérgenos de *L. multiflorum* em pacientes com polinose por ensaio imunoenzimático (ELISA) empregando-se os três extratos Lm;
- Correlacionar os níveis de IgE específica obtidos pelos três extratos entre si;
- Determinar e analisar a resposta de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG4 específicos ao pólen de *L. multiflorum* por ELISA em soros de pacientes atópicos;
- Correlacionar os níveis de IgE específica a Lm com os níveis de IgG1 e IgG4 específicos a Lm.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos, segundo normas da Resolução 196/96, sendo aprovado, sem restrições, em 22 de setembro de 2003, sob processo número 089/2003 (Anexo 1).

3.2. Local do estudo

A coleta dos grãos de pólen de *L. multiflorum* foi realizada em fazendas do município de Caxias do Sul, durante estação polínica do azevém, em outubro de 2004. Pacientes e indivíduos que constituíram os três grupos de estudo eram moradores das cidades de Caxias do Sul (RS) e de Uberlândia (MG), onde foram selecionados em suas respectivas cidades. Caxias do Sul, distante 136 km de Porto Alegre capital do Estado do Rio grande do Sul, situa-se na Região Sul e localiza-se (longitude 51 °W, latitude 29 °S) na encosta superior do Nordeste do Rio Grande do Sul, parte na extremidade leste da microrregião vitivinícola e parte no planalto dos “Campos de Cima da Serra”. Essa região também é conhecida como “Roteiro da Uva e do Vinho”. Com uma área territorial de 1.588,4 km² de extensão, Caxias do Sul está de 760 a 800 m acima do nível do mar, o que determina um clima do tipo Subtropical de altitude com temperatura mínima de –8 °C e máxima de 35 °C (média de 16 °C) e umidade relativa do ar de 84% (Prefeitura Municipal de

Caxias do Sul, 2006). A população estimada para o ano de 2005 é de 404.187 habitantes, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2004).

Uberlândia, situada no sudeste do Brasil, distante 563 km de Belo Horizonte, capital do Estado de Minas Gerais, localiza-se (longitude 48°W, latitude 18°S) na região conhecida como Triângulo Mineiro. Com uma área territorial de 4.116 km² e população estimada para o ano de 2005 de 585.262 habitantes (IBGE, 2004) é uma cidade com clima do tipo Tropical chuvoso, sendo que a vegetação característica é o cerrado.

A seleção dos pacientes ocorreu nas cidades de Caxias do Sul e Uberlândia e a dos indivíduos controles somente em Uberlândia. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

3.3. Coleta de pólen de *L. multiflorum*

Pólen de *L. multiflorum* foram coletados em fazendas do município de Caxias do Sul, com ocorrência predominante desta gramínea sobre as demais, durante a estação de florescimento em outubro de 2004, pelo Prof. Dr. Francisco de Assis Machado Vieira. A gramínea foi mantida por sete dias em uma sala com insolação, previamente preparada, na qual estendeu-se um papel branco. Após a abertura das anteras, os grãos de pólen foram depositados espontaneamente na superfície do papel. Com o uso de estilete, o pólen coletado foi separado de restos vegetais, como as anteras. O pólen coletado foi depositado em tubo de ensaio seco e armazenado a 4°C. O material coletado foi enviado ao Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade

Federal de Uberlândia, onde permaneceu armazenado a 4°C até os procedimentos de extração antigênica.

3.4. Extração antigênica

Inicialmente, grãos de pólen de *L. multiflorum* (Lm) foram purificados através da passagem em peneira de malha especial (*Standard Sieve A.S.T.M*, Newark Wire Cloth CO, Newark, N.J., EUA) com poros de 56 µm. A pureza dos grãos peneirados (aproximadamente 99%) foi verificada por microscopia de luz. A seguir estão apresentadas as três formas de extração antigênica empregadas neste estudo.

3.4.1. Extração em PBS

Após purificação, as frações antigênicas foram extraídas de 50 mg de grãos de pólen adicionando-se 5 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,01 M, pH 7,2, seguindo metodologia anteriormente descrita (BURTON et al., 2002), com modificações. Em seguida, foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases – Leupeptina 1 µM (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA, L-2884), PMSF 1mM (Sigma, P-7626), Benzamidina 1 mM (Sigma, B-6506) e Aprotinina 10 µg/mL (Sigma, A-6279); seguindo de incubação a 4°C por 16 horas sob agitação.

O conteúdo foi centrifugado em alta velocidade (20.000 x *g* por 30 minutos a 4 °C) (Sigma Laborzentrifugess 2K11, Sigma) e o sobrenadante final obtido foi dialisado (SPECTRA/POR® *molecular porous membrane tubing* MWCO: 6-8.000; *Spectrum Medical Industries Inc.*, Houston, TX, EUA) contra PBS a 4°C, por 20

horas, sob agitação. O extrato dialisado foi mantido em tubo de armazenamento a -20°C .

3.4.2. Extração em éter-PBS

Cerca de 50 mg de grãos de pólen purificados foram macerados e em seguida delipidados pela adição de 1:5 éter-etílico (peso/volume) a 4°C por 16 horas, sob agitação orbital constante. Depois de evaporado o éter, o extrato antigênico foi diluído em solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M, pH 7,2 (PBS), de acordo com método descrito anteriormente (CHOWDHURY et al., 1998), com pequenas modificações, sendo adicionado à solução um coquetel de inibidores de proteases, como descrito acima.

Após centrifugação e diálise, o extrato dialisado final foi estocado em tubos de armazenamento a -20°C , como descrito anteriormente.

3.4.3. Extração em bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3)

Depois de peneirado, as frações alergênicas de 50 mg de grãos de pólen foram extraídas pela adição de uma solução de NH_4HCO_3 , 0,125 M, pH 8,0 aos pólenes, de acordo com método descrito anteriormente (FAHLBUSCH et al., 1998). As etapas seguintes foram realizadas conforme descrição anterior, sendo que o extrato dialisado final foi mantido em tubos de armazenamento a -20°C .

3.5. Dosagem protéica e dosagem de carboidratos

O conteúdo protéico dos extratos foi estimado pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como curva padrão de proteína, a soroalbumina bovina (BSA,

Sigma; A-8022), em diluição dupla seriada de 500 µg/mL a 15,6 µg/mL. A leitura da reação foi realizada a 660 nm em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, SP, Brasil). A concentração protéica foi determinada em mg/mL, utilizando-se o *software* Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, EUA).

O conteúdo de carboidratos solúveis totais presentes em cada extrato foi determinado pelo método de antrona (YEMM; WILLIS, 1954), utilizando D-glucose (Sigma; G5400) como padrão na curva de calibração, em diluições seriadas de 500 µg/mL a 15,6 µg/mL. A leitura da reação foi realizada a 625 nm em espectrofotômetro e a concentração de carboidratos foi determinada de forma similar ao procedimento descrito para dosagem de proteínas.

3.6. SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil Sulfato de Sódio

As amostras dos extratos alergênicos foram submetidas à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida a 13,5% (SDS-PAGE), em condições denaturantes e não redutoras segundo Laemmli (1970).

Essas amostras foram primeiramente centrifugadas a 20.000 x *g* por 5 minutos, e então diluídas em Tampão de Amostra 2% (Tris 3 mM, SDS a 1 %, azul de bromofenol a 0,025% e EGTA a 1,1 mM) e aquecidas a 100°C durante 5 minutos. As amostras foram aplicadas ao gel na quantidade de 10 µL/poço (aproximadamente 30 µg de proteína total), e paralelamente foram aplicados padrões de massa molecular (Sigma Marker, Sigma; M4038). O sistema utilizado foi o de eletroforese em mini-gel (SE 215 *Mighty Small Multiple Caster*, Hoefer

Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA). O gel foi submetido a uma corrente constante de 20 mA. A migração das proteínas foi evidenciada pela coloração de nitrato de prata (Labsinth, Diadema, Brasil).

O *software* KODAK 1D (Eastman Kodak Co., Rochester, EUA) foi utilizado para a obtenção dos valores de massa molecular relativa das bandas protéicas, baseado nos valores de mobilidade relativa (rf), calculados pelo próprio *software*, onde também foram calculados os valores de intensidade média de cada banda protéica, sendo calculados em pixels.

3.7. Preparação do extrato alergênico para teste cutâneo de puntura

Para a preparação do extrato bruto para teste cutâneo, o extrato de pólen foi diluído em solução de PBS fenol 0,4%, e glicerina a 50%, em uma concentração final de 1 mg de proteína/mL. O extrato alergênico foi acondicionado em frascos com conta-gotas e mantido a 4°C até o momento do uso nos testes cutâneos de puntura.

3.8. Termo de consentimento e avaliação clínica dos indivíduos do estudo

Todos os participantes deste estudo, ou seu responsável legal, em caso de menores de 18 anos, assinaram o termo de consentimento (Anexo 2) pós-informado, de acordo com as normas da Resolução CNS 196/96.

No termo de consentimento foi informado o nome da pesquisa, bem como seus objetivos, os procedimentos a que seria submetido, como coleta de sangue e

teste cutâneo de leitura imediata e a possibilidade de sua saída do estudo sem necessidade de explicação ou prejuízo ao seu atendimento atual ou futuro.

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

- *Dr. Francisco de Assis Machado Vieira* (Caxias do Sul – RS) – Clínica de Alergia e professor titular de Farmacologia, Departamento de Ciências Biomédicas, Faculdade de Medicina, Universidade de Caxias do Sul, RS;

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

3.9. Teste cutâneo de puntura

A hipersensibilidade imediata a alérgenos de pólen de *L. multiflorum* foi determinada por meio de teste cutâneo pelo método de puntura (TCP). Para a realização do teste foi utilizado extrato bruto glicerinado de pólen de *L. multiflorum*.

Na execução dos testes de puntura nos pacientes com polinose e nos indivíduos controles também foram utilizados extratos alergênicos brutos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), *D. farinae* (Df) e *Blomia tropicalis* (Bt) (IPI/ASAC).

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

Em todos os testes, foram utilizados controle positivo (cloridrato de histamina a 10 mg/mL – IPI/ASAC, Brasil) e controle negativo (solução salina fisiológica em fenol 0,4% e glicerina 50% – IPI/ASAC, Brasil).

Após 15 minutos, procedeu-se a leitura da reação com auxílio de paquímetro ou uma régua específica graduada em milímetros (mm), adotando-se como critério de positividade uma pápula > 3 mm em relação ao controle negativo da reação (diluyente dos extratos alergênicos), obtida pela média de dois diâmetros perpendiculares.

3.10. Seleção de pacientes com polinose e indivíduos controles

Pacientes sintomáticos com polinose

Foram selecionados 62 pacientes apresentando polinose, caracterizada clinicamente por rinoconjuntivite alérgica sazonal e/ou asma brônquica, de acordo exame físico e teste cutâneo imediato de punção (TCP) positivo para o extrato de *Lolium multiflorum* (grupo Lm+). Estes pacientes foram selecionados na Clínica de Alergia do Professor Dr. Francisco de Assis Machado Vieira na cidade de Caxias do Sul – RS, sendo composto por indivíduos na faixa etária de 6 a 65 anos ($32 \pm 11,3$ anos), de ambos os sexos (31 homens e 31 mulheres).

Indivíduos controle

Como grupo controle dos pacientes com polinose, foram selecionados 30 pacientes sintomáticos (rinite alérgica perene e/ou asma brônquica moderada a grave), sensíveis a alérgenos de ácaros, mas não a alérgenos de pólen gramíneas, com teste cutâneo de puntura negativo ao extrato bruto de Lm, porém positivo ao extrato bruto de alérgenos de ácaros (grupo Lm-). Destes, 14 pacientes de ambos os sexos, com faixa etária de 8 a 50 anos (4 homens e 10 mulheres; $23 \pm 10,9$ anos) foram selecionados em Caxias do Sul (Lm-CS) e 16 pacientes de ambos os sexos, com faixa etária de 20 a 40 anos (9 homens e 11 mulheres; $27 \pm 6,9$ anos), em Uberlândia (Lm-Udi). Trinta indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, com faixa etária de 18 a 56 anos, (13 homens e 27 mulheres; $27 \pm 10,9$ anos) assintomáticos quanto a qualquer doença alérgica e com teste cutâneo negativo ao extrato de *L. multiflorum* constituíram o terceiro grupo controle (grupo NA), selecionados na cidade de Uberlândia – MG.

3.11. Coleta de sangue

Amostras de sangue (5 mL de crianças e 15 mL de adultos) dos indivíduos foram coletadas na mesma ocasião da realização do teste cutâneo, com a utilização de tubos Vacutainer (Vacutainer – Precision Glide/Becton Dickson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, EUA) e agulhas (25 x 8 mm) para punção venosa na região do antebraço. Após a formação de coágulo, os tubos foram centrifugados a $1.000 \times g$ por 10 minutos, e os soros obtidos foram aliquotados, e armazenados a -20°C para realização de testes sorológicos.

3.12. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IgE sérica específica a alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum*

Para a detecção de anticorpos IgE anti-*L. multiflorum* foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizando amostras de soros de pacientes atópicos e não atópicos, segundo técnica de ELISA descrita por Sopelete et al. (2006), com modificações. Foram utilizados como antígenos os três extratos brutos de *L. multiflorum* obtidos previamente (extrato Lm_{PBS}, extrato Lm_{e-PBS} e extrato Lm_{NH₄HCO₃}).

Microplacas de poliestireno de alta afinidade, com 96 poços (*Corning Incorporated Costar®*, *Corning Laboratories Inc.*, NY, EUA; 3590), foram sensibilizadas com cada extrato de pólen de Lm, separadamente, à concentração de 20 µg/mL em um volume de 50 µL/poço, diluídos em tampão carbonato pH 9,6 por 16 horas.

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

As amostras de soro foram diluídas a 1:2, testadas em duplicata, e incubadas a 37°C por duas horas em câmara úmida. Foram utilizados controles positivos e controles negativos. Após esta etapa, uma IgG de cabra anti-IgE humana marcada com biotina (*Kirkegaard e Perry Laboratories Inc.*, *Gaithersburg*, MD, EUA; nº 16-10-04) na diluição de 1:1000 foi adicionada, seguindo de incubação por uma hora a 37°C. Subseqüentemente, o conjugado Estreptavidina-

Peroxidase (Sigma; S-5512) foi adicionado às placas na diluição de 1:1000 e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos.

Terminado o último ciclo de lavagens, foi adicionado o substrato enzimático, constituído de uma solução de *2,2'-diazino-bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid* 0,01 M (ABTS, Sigma; A-1888) em tampão citrato-fosfato 0,07 M, pH 4,2, contendo água oxigenada 0,03% (Sigma).

Para determinar os valores de densidade óptica (DO) foi utilizado o leitor de ELISA (*Titertek Multiskan Plus MkII*, Flow Laboratories, Mc Lean, VA, EUA) a 405 nm.

O limiar de positividade foi determinado – *cut off* – pela média dos valores de DO dos soros controles, acrescidos de cinco desvios padrões. O índice ELISA (IE) expressa arbitrariamente os níveis de anticorpos IgE, sendo este índice calculado pela fórmula:

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

Onde,

DO_{amostra}: densidade óptica média obtida de cada amostra de soro

Desta forma, IE > 1,2 foram considerados positivos quanto à presença de IgE específica a alérgenos de pólen de *L. multiflorum*. Este valor foi adotado para excluir valores próximos ao limiar de positividade da reação.

3.13. Ensaio imunoenzimático – ELISA - para detecção de IgG1 e IgG4 específicos a alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum*

De acordo com os resultados do ELISA-IgE, o extrato Lm_{PBS} foi escolhido para avaliar a resposta das subclasses de anticorpos IgG1 e IgG4 específicos anti-*L. multiflorum* por ELISA, segundo técnica de ELISA padronizada no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia a alérgenos de pólen de Lm.

Microplacas de poliestireno de alta afinidade, com 96 poços (*Corning Incorporated Costar®*, *Corning Laboratories Inc.*, NY, EUA; 3590) foram sensibilizadas com o extrato bruto Lm_{PBS} à concentração de 20 µg/mL em um volume de 50 µL/poço, diluído em tampão carbonato pH 9,6 por 16 horas.

O diluente das amostras e a solução de lavagem foram os mesmos utilizados no ELISA-IgE. As placas foram lavadas em PBS-T e bloqueadas com PBS-T-BSA por uma hora à temperatura ambiente. Amostras de soro diluídas 1:5 foram testadas em duplicata, e incubadas a 37°C por 1 hora em câmara úmida. Em cada placa foram utilizados três controles positivos e três controles negativos. Posteriormente, foram adicionados os respectivos anticorpos secundários consistindo de anti-IgG1 humana biotinilada (1:200; Sigma, B6775) e anti-IgG4 humana biotinilada (1:2000; Sigma, B3648), seguido de incubação por uma hora a 37°C. Subseqüentemente, o conjugado Estreptavidina-Peroxidase (Sigma; S-5512) foi adicionado às placas na diluição de 1:500 e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos.

Terminado o último ciclo de lavagens, foi adicionado o substrato enzimático, constituído de uma solução de ABTS (Sigma; A-1888) em tampão citrato-fosfato, contendo H_2O_2 0,03%.

Para determinar os valores de densidade óptica (DO) foi utilizado o leitor de ELISA (*Titertek Multiskan Plus MkII*) a 405 nm.

O limiar de positividade foi determinado – *cut off* – pela média dos valores de DO dos soros controles, acrescidos de três desvios padrões. O índice ELISA (IE) expressa arbitrariamente os níveis de anticorpos, sendo este índice calculado pela fórmula descrita anteriormente para o ELISA-IgE. Valores de $\text{IE} > 1,2$ foram considerados positivos quanto à presença de IgG1 e IgG4 específicos a alérgenos de pólen de *L. multiflorum*.

3.14. Normas de biossegurança

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

3.15. Análise estatística

Inicialmente, para análises de comparações de média aritmética, foi realizado teste de normalidade a partir do qual foi possível verificar que as variáveis não apresentavam uma distribuição normal.

O teste de probabilidade exato de Fisher ou o teste de χ^2 foi empregado para avaliar diferenças entre porcentagens de positividade entre os grupos e entre extratos ao teste cutâneo de puntura e ao ELISA.

Correlação entre os níveis de anticorpos foi realizada pelo teste de Spearman (correlação não paramétrica).

Comparações entre grupos e extratos quanto ao tamanho médio de pápula ao TCP e níveis de IgE, IgG1 e IgG4 específicos foram realizadas pelo teste Kruskal-Wallis, usando como *post-hoc test*, o teste múltiplo de comparação de Dunn.

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

Todos os cálculos estatísticos e gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Características gerais dos pacientes e teste cutâneo de puntura

Os pacientes e indivíduos analisados neste estudo foram divididos em 3 grupos, de acordo com a positividade no TCP ao extrato de pólen de *L. multiflorum*: (1) grupo Lm+: pacientes com histórico clínico de polinose e TCP positivo ao extrato de *L. multiflorum*; (2) grupo Lm–: pacientes atópicos sintomáticos com TCP negativo ao extrato de *L. multiflorum*, porém positivo aos extratos de ácaros. Esse grupo foi subdividido em pacientes residentes em Caxias do Sul (subgrupo Lm–CS) e em Uberlândia (subgrupo Lm–Udi); e (3) grupo NA: indivíduos não atópicos e TCP negativo a qualquer extrato alergênico testado. Na tabela 1 estão apresentados os quatro grupos com suas características quanto ao sexo, idade, diagnóstico clínico e resultados de TCP aos extratos testados.

Quanto à história clínica, rinite alérgica foi o diagnóstico clínico predominantemente observado nos grupos Lm+ e Lm–, com nenhuma diferença significativa entre os grupos. Por outro lado, a conjuntivite foi significativamente mais freqüente no grupo Lm+ que no grupo Lm– ($p < 0,0001$), sendo que dentro do grupo Lm– foi observada maior freqüência de conjuntivite nos pacientes residentes em Caxias do Sul (Lm–CS) do que nos pacientes residentes em Uberlândia (Lm–Udi) ($p = 0,0051$). A freqüência de asma foi semelhante nos três grupos de pacientes atópicos (Lm+ = 11%, Lm–CS = 7% e Lm–Udi = 25%)

Tabela 1. Distribuição por idade, sexo, história clínica e resultado de TCP (diâmetro médio de pápula e positividade) de pacientes com polinose e TCP positivo a extrato de pólen (Lm+), de pacientes atópicos e TCP negativo a extrato de pólen (Lm-) e de indivíduos não atópicos (NA). Ao TCP um resultado positivo foi determinado a partir do diâmetro médio de duas medidas perpendiculares da pápula formada e definido como > 3 mm em relação ao controle negativo da reação.

Características	Grupos			
	Lm+	Lm-		NA
		Lm-CS	Lm-Udi	
Número de indivíduos	62	14	16	30
Idade Média (anos)*	32 ± 11,3	23 ± 10,9	27 ± 6,9	27 ± 10,4
Sexo (Masculino/Feminino)	31/31	4/10	9/7	13/17
Diagnóstico Clínico (n, %)				
Rinite alérgica	55 (88%) ^a	14 (100%) ^a	16 (100%) ^a	0
Conjuntivite	50 (80%) ^a	6 (43%) ^b	0 ^c	0
Asma	7 (11%) ^a	1 (7%) ^a	4 (25%) ^a	0
Positividade ao TCP (diâmetro médio de pápula, mm / positividade, %)				
<i>L. multiflorum</i>	11,3 100%	0	0	0
<i>D. pteronyssinus</i>	4,7 ^a 45% ^a	6,4 ^{a,b} 100% ^b	8,4 ^b 94% ^b	0
<i>D. farinae</i>	4,4 ^a 21% ^a	5,4 ^a 79% ^b	6,6 ^a 94% ^b	0
<i>B. tropicalis</i>	4,9 ^a 26% ^a	4,9 ^a 93% ^b	6,4 ^a 87% ^b	0

* Média ± desvio padrão. ^{a, b, c} Diferentes letras indicam diferença estatística significativa entre os grupos (p < 0,05)

Devido ao critério de seleção, o grupo Lm+ apresentou 100% de positividade ao extrato de pólen de *L. multiflorum*, sendo que os demais grupos foram negativos a esse extrato alergênico.

Quanto ao tamanho médio de pápula no TCP para os extratos de ácaros, houve diferença significativa somente para o extrato Dp, sendo maior no subgrupo Lm–Udi (8,4 mm) que no grupo Lm+ (4,7 mm) ($p < 0,01$).

Em relação à positividade, houve uma maior positividade aos extratos de ácaros no grupo Lm– (100%) que no grupo Lm+ (48%) ($p < 0,05$), com nenhuma diferença significativa entre os grupos Lm–CS e Lm–Udi ($p > 0,05$).

Considerando o critério de seleção dos grupos, todos os pacientes do grupo NA foram negativos para todos os extratos alergênicos testados.

4.2. Análise eletroforética, conteúdo protéico e de carboidratos de extratos de pólen de Lm

O perfil protéico dos extratos em gel corado por nitrato de prata apresentou diferenças sutis entre os três extratos avaliados. Foi possível visualizar um amplo espectro de bandas protéicas, variando de 20 a 100 kDa (figura 1A). No extrato Lm_{PBS}, 13 frações protéicas foram visualizadas (20, 22, 24, 27, 31, 40–51, 56, 65, 79, 87, 92 e 100 kDa), sendo que o extrato Lm_{e-PBS} apresentou um perfil protéico muito semelhante ao extrato Lm_{PBS}. No extrato Lm_{NH₄HCO₃}, bandas de 40 e 79 kDa não puderam ser visualizadas. A figura 1B representa o perfil da intensidade média das bandas protéicas (em pixels) mais evidentes (87, 79, 65, 30, 27, 24, 22, e 20 kDa) nos três extratos antigênicos.

Analisando-se o conteúdo protéico dos três extratos, o rendimento protéico da extração não apresentou uma considerável diferença entre os extratos, porém para o extrato Lm_{PBS} uma concentração protéica ligeiramente maior foi obtida (7 mg/mL) quando comparada aos extratos Lm_{e-PBS} (6 mg/mL) e $Lm_{NH_4HCO_3}$ (6,7 mg/mL).

O conteúdo de carboidratos estimado foi de 1,8 mg/mL para o extrato Lm_{PBS} , 2,7 mg/mL para o extrato Lm_{e-PBS} , e de 2,0 mg/mL para o extrato $Lm_{NH_4HCO_3}$.

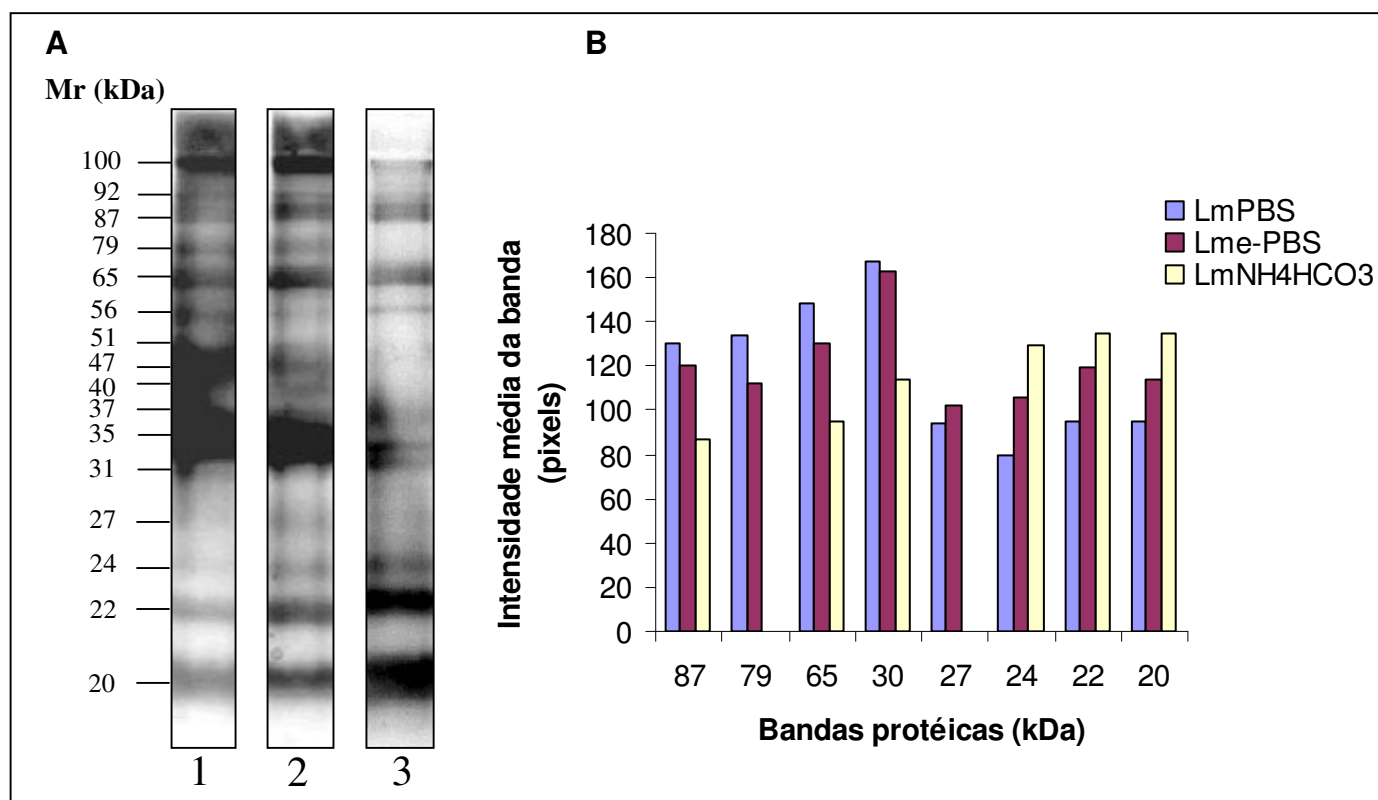


Figura 1. (A) Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 13,5% das frações protéicas contidas nos extratos Lm_{PBS} (1), Lm_{e-PBS} (2) e $Lm_{NH_4HCO_3}$ (3). (B) Perfil de intensidade das bandas protéicas mais evidentes nos extratos Lm_{PBS} , Lm_{e-PBS} e $Lm_{NH_4HCO_3}$.

4.3. IgE sérica específica aos extratos de Lm

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram empregados para a detecção dos níveis de IgE sérica específica a alérgenos de pólen dos três extratos de Lm. Para as análises das respostas anticórpicas, os grupos Lm-CS e Lm-Udi foram analisados conjuntamente como o grupo Lm-.

No grupo Lm+, o nível médio de IgE específica a Lm foi significativamente maior usando o extrato Lm_{PBS} (IE = $17,6 \pm 5,3$) que usando os extratos Lm_{e-PBS} (IE = $13,9 \pm 6,1$; $p < 0,01$) e Lm_{NH₄HCO₃} (IE = $15,1 \pm 5,1$; $p < 0,05$) (figura 2).

Os valores médios de IgE específica empregando-se qualquer extrato Lm foram significativamente maiores no grupo Lm+ que nos grupos Lm- e NA ($p < 0,001$). Semelhantemente, a taxa de positividade ao se utilizar qualquer um dos três extratos Lm foi maior no grupo Lm+ que nos outros grupos ($p < 0,0001$), com nenhuma diferença significativa entre as taxas de positividade obtidas para cada extrato.

Em relação à correlação entre os níveis de IgE específica a Lm entre os três extratos, uma significativa correlação positiva foi encontrada entre os três extratos (figura 3), particularmente entre os extratos Lm_{PBS} e Lm_{NH₄HCO₃} ($r_s = 0,7060$; $p < 0,0001$; figura 3A), seguido pelos extratos Lm_{PBS} e Lm_{e-PBS} ($r_s = 0,5184$; $p < 0,0001$; figura 3B) e entre os extratos Lm_{e-PBS} e Lm_{NH₄HCO₃} ($r_s = 0,4532$; $p = 0,002$; figura 3C).

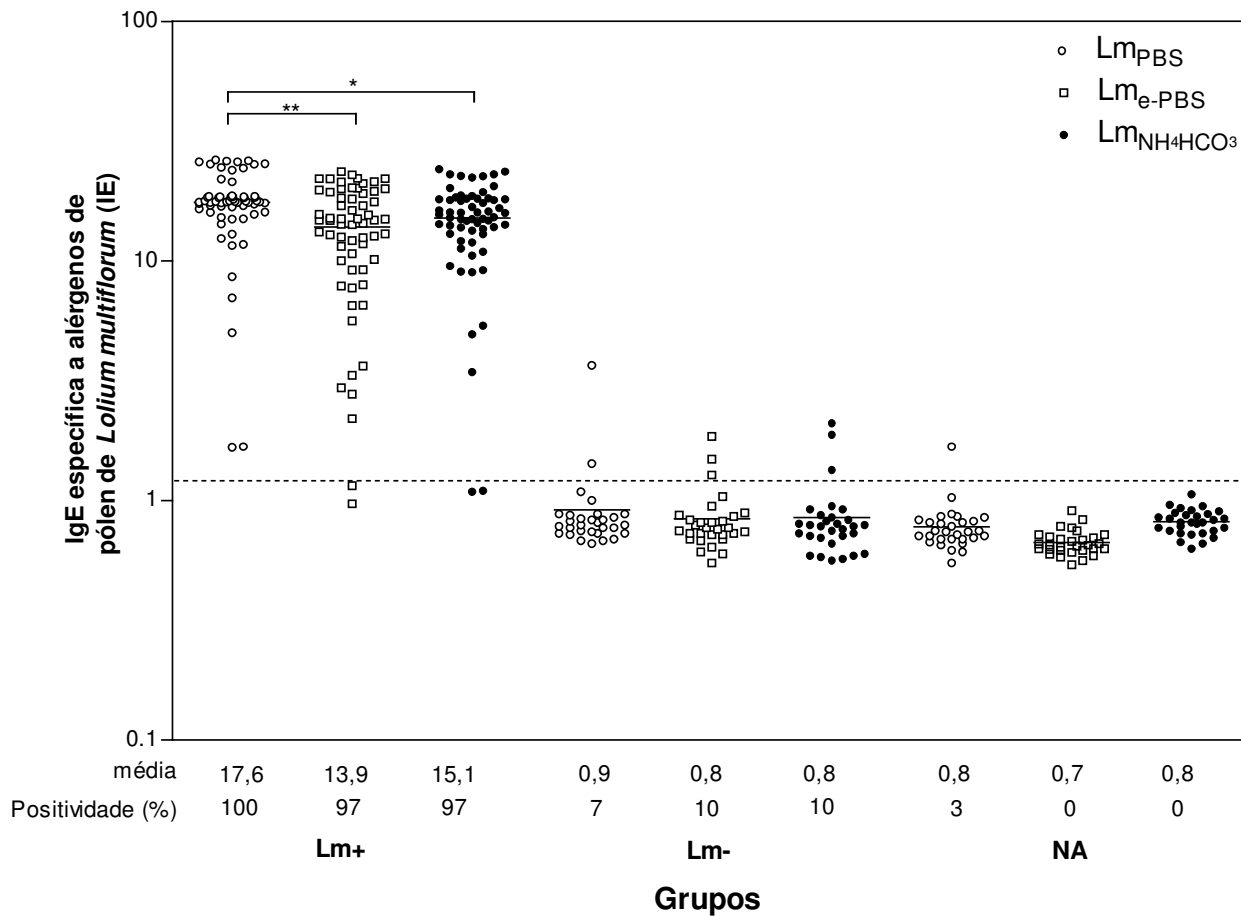


Figura 2. Níveis de IgE específica a alérgenos de pólen de Lm obtidos pelo teste ELISA e expressos em Índice ELISA (IE) usando três extratos Lm (Lm_{PBS} , Lm_{e-PBS} e $Lm_{NH_4HCO_3}$) em 62 amostras de soros de pacientes com TCP positivo a Lm (grupo Lm+), 30 amostras de soros de pacientes TCP negativo a Lm (grupo Lm-) e 30 amostras de soros de indivíduos não-atópicos (grupo NA). As barras horizontais em cada coluna representam a média do grupo para cada extrato e a linha tracejada o limiar de positividade do teste (IE = 1,2). Média aritmética e positividade (%) estão também representadas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

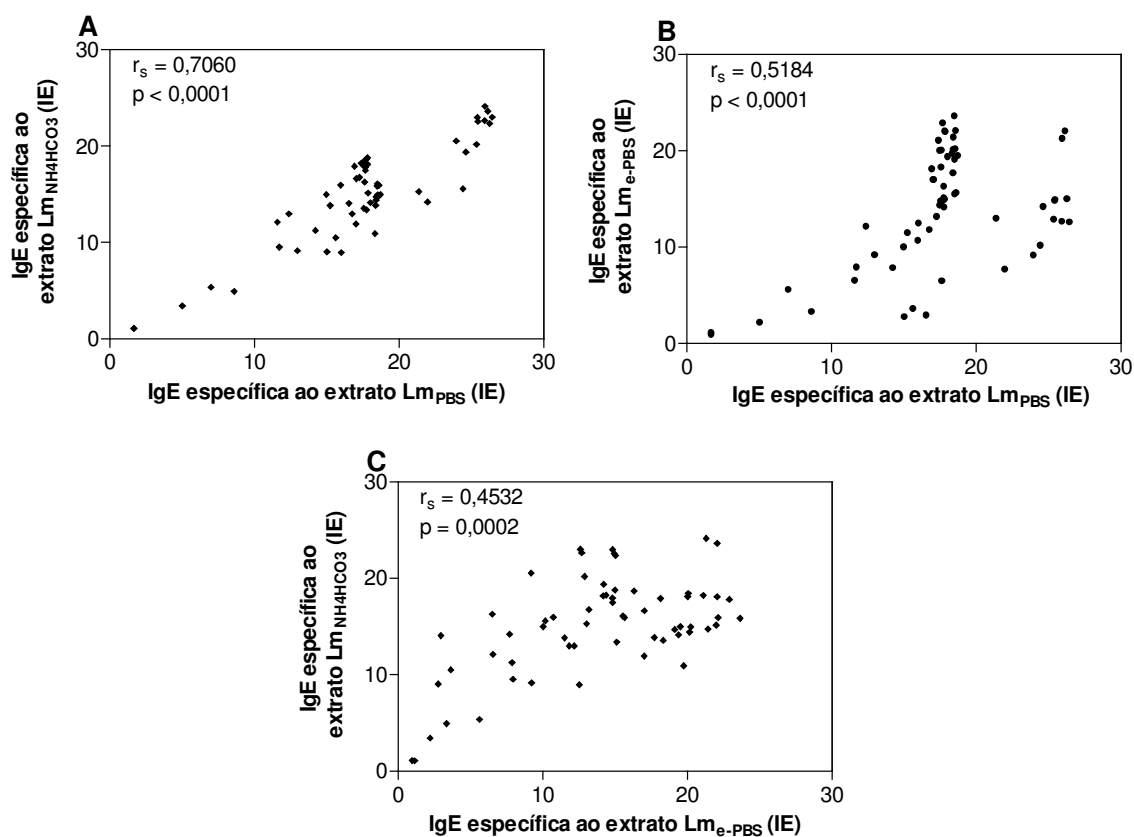


Figura 3. Correlações dos níveis de IgE específica a alérgenos de pólen de Lm obtidos por ELISA e expressos em Índice ELISA (IE) entre os três extratos analisados: Lm_{PBS} , Lm_{e-PBS} e $Lm_{NH_4HCO_3}$ no grupo Lm+. Correlação de Spearman (r_s)

4.4. IgE, IgG1 e IgG4 específicos a pólen de Lm

O extrato Lm_{PBS} foi empregado no ELISA para detecção de anticorpos IgG1 e IgG4 específicos a pólen de *L. multiflorum* em todos os grupos estudados.

Os níveis médios de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 foram significativamente maiores no grupo Lm+ que nos grupos Lm- e NA ($p < 0,001$) (figura 4). Ao se comparar as diferentes classes e subclasses de anticorpos no grupo Lm+, os níveis médios de anticorpos IgE específicos a Lm ($IE = 17,6 \pm 5,3$) foram significativamente maiores que os níveis de anticorpos IgG1 ($IE = 2,6 \pm 2,6$) e IgG4 ($IE = 3,6 \pm 2,8$) ($p < 0,001$). No grupo Lm+, a taxa de positividade para IgE (100%) e IgG4 (87%) foram significativamente maiores que para IgG1 (61%) ($p < 0,0001$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os níveis de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 ou entre as taxas de positividade nos grupos Lm- e NA, embora 20% dos pacientes do grupo Lm- e 10% do grupo NA apresentaram resultados positivos para anticorpos IgG1.

Fracas, porém significantes correlações foram encontradas entre os níveis de anticorpos IgG1 e IgG4 ($r_s = 0,40$; $p = 0,0012$) (figura 5A) e entre os níveis de anticorpos IgE e IgG4 ($r_s = 0,38$; $p = 0,0024$) (figura 5B), não sendo encontrada correlação entre os níveis de IgE e IgG1 ($r_s = 0,25$; $p = 0,0501$).

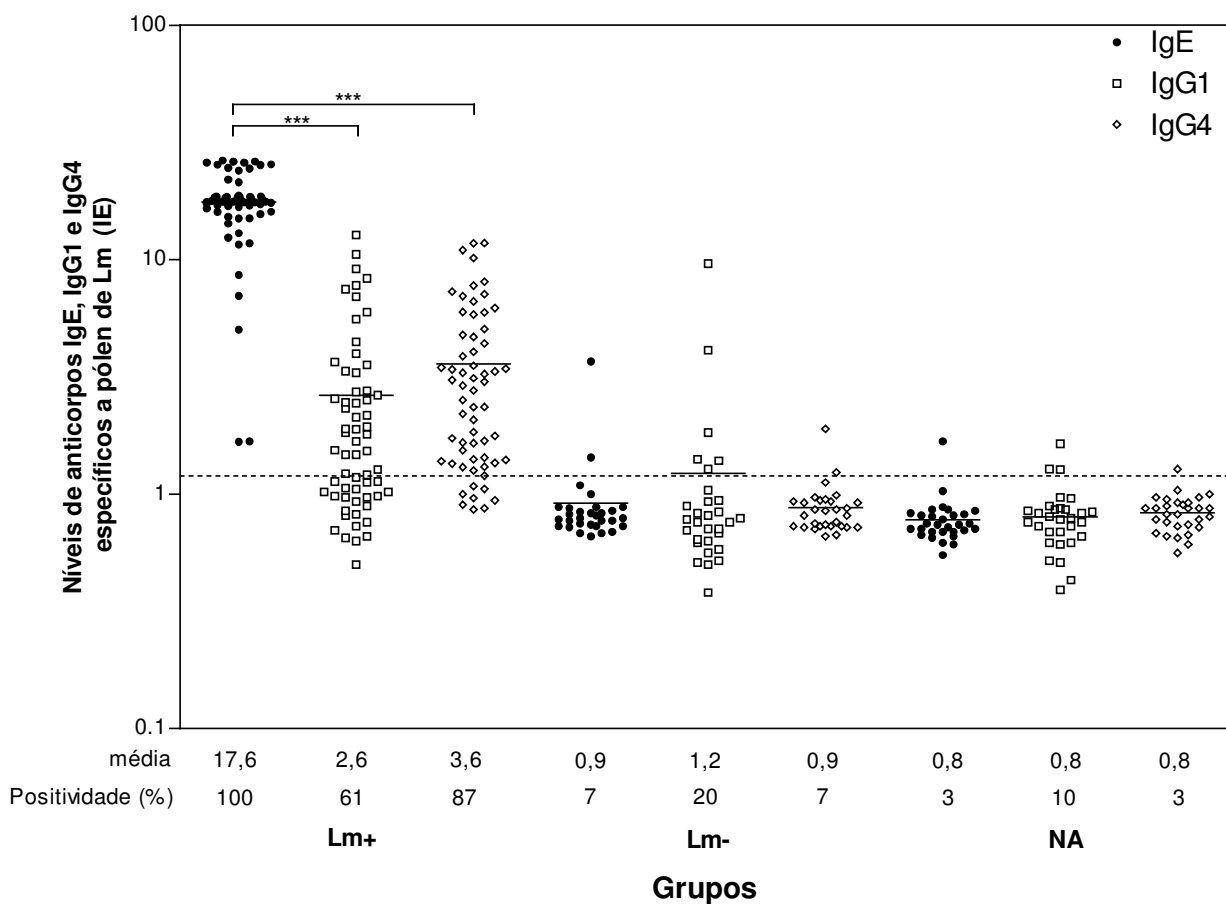


Figura 4. Níveis de IgE, IgG1 e IgG4 específicos a alérgenos de pólen de Lm, obtidos através de ELISA e expressos em Índice ELISA (IE) empregando-se o extrato Lm_{PBS} em 62 amostras de soros de pacientes com TCP positivo a Lm (grupo Lm+), 30 amostras de soros de pacientes TCP negativo a Lm (grupo Lm-) e 30 amostras de soros de indivíduos não-atópicos (grupo NA). As barras horizontais em cada coluna representam a média do grupo para cada anticorpo e a linha tracejada o limiar de positividade do teste (IE = 1,2). Média aritmética e positividade (%) estão também representadas. *** $p < 0,001$.

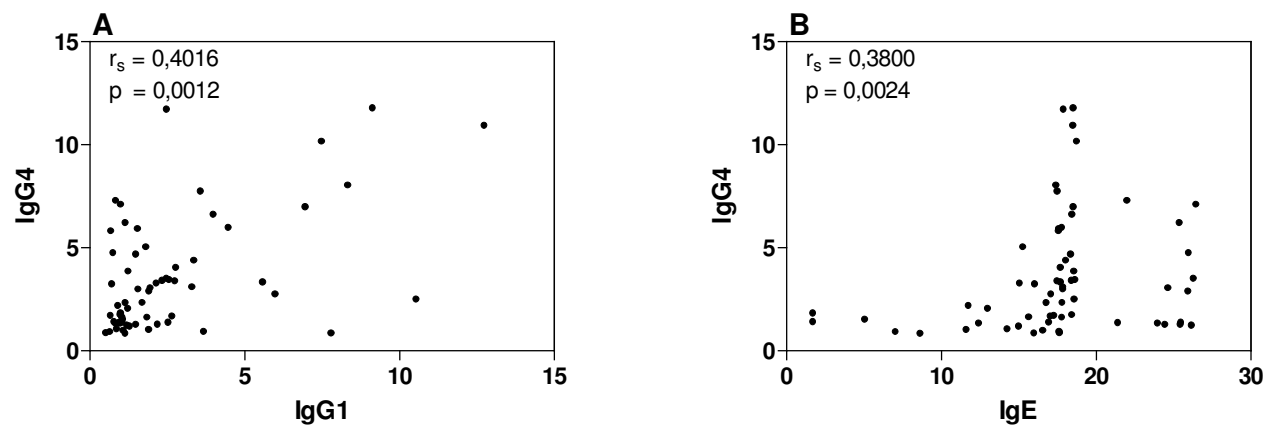


Figura 5. Correlações entre os níveis de IgG1 e IgG4 (A) e entre os níveis de IgE e IgG4 (B) específicos a antígenos de pólen de Lm obtidos por ELISA e expressos em Índice ELISA (IE) no grupo Lm+. Correlação de Spearman (r_s)

5. DISCUSSÃO

Alergia a pólen de gramíneas é uma causa comum de morbidade e grande perda econômica, com um número crescente de espécies de gramíneas sendo reconhecidas como importantes fontes alergênicas (LOVBORG, 1999). Entre as diferentes espécies de gramíneas, os grãos de pólen de *Lolium multiflorum* têm sido considerados responsáveis pelo desenvolvimento de respostas alérgicas em pacientes residentes em áreas de ocorrência dessa gramínea (VIEIRA; FERREIRA; MATTER, 2005). Até o momento, não há nenhum extrato comercial de pólen de *Lolium mutiflorum* disponível no Brasil para o diagnóstico de polinose causada pelo pólen desta gramínea. Este estudo representa um primeiro passo para a padronização de extratos confiáveis para diagnóstico e possivelmente para imunoterapia.

Extratos comerciais contendo pólenes de várias gramíneas têm sido utilizados rotineiramente para o diagnóstico de polinose, no Sul do Brasil. Contudo, esse extrato contém pólenes de gramíneas que não são cultivadas em larga escala na região, dentre eles o pólen de *L. perenne*, cujos alérgenos apresentam uma grande homologia e reatividade cruzada com alérgenos de pólenes de outras gramíneas da mesma família e subfamília (FAHLBUSCH et al., 1998; WEBER, 2003).

Os extratos alergênicos para o diagnóstico e tratamento são comumente heterogêneos, contendo uma mistura de proteínas alergênicas e não-alergênicas. Os principais alérgenos inaláveis têm sido identificados e inúmeros esforços têm sido realizados para definir a composição destes complexos extratos alergênicos

(QUIRALTE et al., 2002). A padronização é um requisito fundamental para a fabricação de extratos alergênicos (NELSON, 2000). Neste contexto, foram testados três diferentes métodos de extração alergênica dos grãos de pólen de *L. multiflorum* em relação à reatividade de IgE para serem utilizados em análises *in vivo* ou *in vitro*.

O extrato Lm_{PBS} foi empregado para selecionar, através do TCP, os pacientes do estudo de acordo com a reatividade ao extrato. Adicionalmente, as análises *in vitro* (ELISA) empregadas no estudo indicaram que o extrato Lm_{PBS} foi o mais adequado ao detectar anticorpos IgE específicos a Lm no soro de pacientes com polinose, já que estes pacientes apresentaram níveis médios de IgE sérica específica mais altos quando utilizou-se o extrato Lm_{PBS}. De maneira semelhante, em um estudo sobre a extração de pólen de oliveira usando diferentes diluentes, foi obtida uma maior eficiência na extração quando se utilizou PBS como diluente. A presença de sais, como NaCl, equilibra o meio atrasando a ruptura dos grãos de pólen, conferindo um efeito protetor aos alérgenos. Dessa forma, a extração com sais é mais eficiente, porém demanda maior tempo de extração (CARNÉS et al., 2002).

Ao se analisar o perfil eletroforético dos três diferentes extratos, foi possível visualizar bandas protéicas variando de 27 a 37 kDa no extrato Lm_{PBS}, de 27 a 35 kDa no extrato Lm_{e-PBS}, e de 30 a 36 kDa no extrato Lm_{NH₄HCO₃}, que poderiam conter os alérgenos dos grupos 1 e 5, os mais importantes grupos de alérgenos de pólenes de gramíneas. Alérgenos do grupo 1 (27-35 kDa) e do grupo 5 (27-38 kDa) são responsáveis por 95% e 85% da reatividade de IgE, respectivamente, em pacientes com polinose, e um alérgeno de *L. multiflorum*, Lol m 5, com massa

molecular de 27-38 kDa tem sido relatado (MOHAPATRA; LOCKEY; SHIRLEY, 2005). Em um estudo usando anticorpo monoclonal específico a Phl p 5 (alérgeno de grupo 5 de *Phleum pratense*), foram detectados em alguns extratos de gramíneas, incluindo extrato de *L. multiflorum* (SCHÄPPI et al., 1999). Entretanto, a relação das bandas protéicas encontradas neste estudo com alérgenos estabelecidos deverá ser confirmada em futuros estudos caracterizando-se detalhadamente estas proteínas de Lm através de estudos de inibição ou ligação direta com anticorpos específicos, focalização isoeletrica, mapeamento de peptídeos, seqüenciamento de peptídeos, ou clonagem de cDNA.

A análise da intensidade média das bandas protéicas mais evidentes nos três extratos resultou em um perfil interessante de suas distribuições nos extratos, podendo-se verificar que nos extratos à base de PBS (Lm_{PBS} e Lm_{e-PBS}), as maiores intensidades estão nos componentes acima de 30 kDa enquanto que no extrato $Lm_{NH_4HCO_3}$, os componentes abaixo de 30 kDa apresentam intensidades maiores. Esses dados sugerem que um determinado diluente pode favorecer ou não o aparecimento de determinado componente protéico nos extratos analisados. A solução de extração pode determinar o perfil alergênico e antigênico dos extratos, uma vez que os alérgenos não são igualmente solúveis em diferentes diluentes (CARNÉS et al., 2002). Estudos mais detalhados destes extratos serão necessários para a obtenção de resultados mais conclusivos sobre as suas características bioquímicas.

Os três extratos apresentaram quantidades consideráveis de carboidratos, confirmando a presença destes componentes nos grãos de pólenes de *Lolium*

multiflorum, confirmando a afirmação de Knox (1979) de que o grão de pólen apresenta cerca de 37% de carboidratos em sua constituição.

Em geral, estudos sobre a caracterização dos principais alérgenos de *L. multiflorum* são escassos. Contudo, há vários estudos relacionados à caracterização e sensibilização alergênica de pólenes de *Lolium perenne*, uma gramínea do mesmo gênero que o *L. multiflorum* (FREIDHOFF et al., 1986; LOVBORG et al., 1999). *L. perenne* é a gramínea mais freqüentemente associada a rinoconjuntivite alérgica sazonal, em regiões de clima temperado, como Estados Unidos e Europa (KNOX; SUPHIOGLU, 1996; SCHÄPPI et al., 1999). Lol p 1 e Lol p 5, seus principais alérgenos, já foram bem estudados por microscopia eletrônica de transmissão e imunocitoquímica (STAFF et al., 1990; SINGH et al., 1991).

Com relação ao diagnóstico clínico, em nosso estudo, rinite alérgica foi o diagnóstico mais freqüente, tanto no grupo Lm+ (pacientes com rinoconjuntivite alérgica sazonal a pólen de gramíneas), quanto no grupo Lm- (pacientes com rinite alérgica perene a ácaros da poeira domiciliar). Uma alta freqüência de conjuntivite foi encontrada nos pacientes com polinose, destacando sua importância nesta doença, uma vez que os alérgenos do grão de pólen ao entrarem em contato, com a mucosa nasal e conjuntiva ocular podem desencadear sintomas relacionados a rinoconjuntivite (DUTRA; ROSÁRIO-FILHO; ZAVADINIAK, 2001).

Pacientes com rinite alérgica perene a ácaros da poeira domiciliar, residentes em Caxias do Sul (subgrupo Lm-CS) também apresentaram sintomas de rinoconjuntivite, embora em uma menor freqüência (43%) que os pacientes com polinose (80%). Por outro lado, pacientes com rinite alérgica perene a ácaros da

poeira domiciliar, residentes em Uberlândia (subgrupo Lm–Udi) não apresentaram nenhum sintoma de conjuntivite, sugerindo que as diferenças ambientais poderiam estar refletindo em uma exposição a outras fontes de pólen de gramíneas com o conseqüente envolvimento ocular. Além disso, os dois grupos foram selecionados de maneira diferente, sendo que o subgrupo Lm–CS foi selecionado em uma clínica de alergia geral, em Caxias do Sul, RS, onde a polinose é freqüente, e a gramínea, *L. multiflorum*, está presente, enquanto que o subgrupo Lm–Udi foi selecionado em uma unidade de atendimento de alergia respiratória, na cidade de Uberlândia, MG, onde não há a presença dessa gramínea e casos de polinose são menos freqüentes.

Um aumento na prevalência de rinoconjuntivite em crianças foi relatado em um período de seis anos (1995-2001) em Curitiba, Sul do Brasil (RIED et al., 2005), sendo demonstrado que pacientes com polinose desenvolvem sintomas na conjuntiva nos estágios iniciais da estação de polinização de gramíneas (LIPIEC et al., 2005).

Em relação ao TCP, considerando o critério de seleção, todos os pacientes incluídos no grupo Lm+ apresentaram TCP positivo ao extrato de Lm. Com relação aos extratos de ácaros, a média de pápula ao TCP, somente com relação ao extrato de *D. pteronyssinus*, foi maior no subgrupo Lm–Udi que no grupo Lm+, demonstrando a importância deste ácaro na sensibilização de pacientes atópicos.

Os subgrupos Lm–CS e Lm–Udi apresentaram uma maior positividade a extratos de ácaros que os pacientes do grupo Lm+, sugerindo que os pacientes com rinoconjuntivite alérgica sazonal, apresentando história clínica predominante de rinoconjuntivite, estavam sensibilizados principalmente a alérgenos de pólen de

gramíneas e não a ácaros, o que poderia ser parcialmente justificado pelo critério de seleção adotado nesse estudo.

Alérgenos de ácaros são importantes agentes sensibilizantes, particularmente na asma e rinite alérgicas. Ácaros das espécies *D. pteronyssinus* e *D. farinae* são predominantes e de maior importância clínica na asma, em regiões de clima temperado, (PLATTIS-MILLS et al., 1992), enquanto que, aliado a eles, *B. tropicalis* é uma importante fonte de alérgeno de ácaro em países de clima tropical e subtropical (ARRUDA et al., 1991; GELLER; ESCH; FERNANDEZ-CALDAS, 1993). Estudos anteriores demonstraram a importância desses ácaros na sensibilização de pacientes atópicos no Brasil (ARRUDA et al., 1991; GELLER; ESCH; FERNANDEZ-CALDAS, 1993; RIZZO et al., 1993; SARINHO et al., 1996).

Por outro lado, a alta positividade no TCP a extratos de ácaros em pacientes do grupo Lm-, reflete a importância desses alérgenos na sensibilização dos pacientes atópicos desse grupo. Contudo, as semelhantes taxas de positividade no TCP, considerando os três extratos de ácaros, entre pacientes do grupo Lm-, selecionados em Caxias do Sul e Uberlândia, sugerem que a sensibilização a alérgenos de ácaros parece ser similar nessas duas regiões geográficas.

Com relação aos níveis de IgE específica a alérgenos de pólen de Lm, os extratos Lm_{PBS}, Lm_{e-PBS} e Lm_{NH₄HCO₃} foram empregados, e os níveis de IgE foram maiores quando o extrato Lm_{PBS} foi utilizado. A correlação positiva encontrada entre os níveis de IgE para os três extratos, sendo mais forte entre os extratos Lm_{PBS} e Lm_{NH₄HCO₃}, demonstra que os extratos poderiam ser empregados no diagnóstico de polinose. Considerando estes resultados bem como a forma mais fácil de extração, o rendimento protéico ligeiramente superior e os altos níveis de

IgE específica no ELISA, o extrato Lm_{PBS} foi escolhido para ser empregado no ELISA para a detecção de anticorpos IgG1 e IgG4.

Geralmente, os níveis de IgG1 e IgG4 a alérgenos são avaliados em pacientes sob imunoterapia específica (ROSSI et al., 2004; JUTEL et al., 2005), assim há uma escassez de estudos com relação a estes anticorpos induzidos pela exposição natural.

Níveis de IgE, IgG1 e IgG4 específicos a Lm no ELISA usando o extrato Lm_{PBS} foram significativamente maiores em pacientes com polinose. Além disso, encontramos uma significativa diferença na positividade entre as classes e subclasses de anticorpos no grupo Lm+, com uma maior positividade para IgE específica a Lm, seguida por IgG4 e IgG1. Nos pacientes não-atópicos, baixa positividade foi encontrada para todos os anticorpos. Estes achados estão de acordo com outros estudos que relataram que além dos anticorpos da classe IgE, anticorpos da subclasse IgG4 são predominantes no soro de pacientes alérgicos (KENEMY et al., 1989; HAMMARSTROM; SMITH, 1987). Kenemy et al. (1989) detectaram anticorpos IgG4 a pólen de *Phleum pratense* (grama timóteo ou *timothy grass*) em 72% dos pacientes alérgicos e em apenas 19% dos indivíduos não-atópicos, e em relação à IgG1, foram detectados anticorpos IgG1 a pólen de gramíneas na maioria dos pacientes atópicos (81%) e, principalmente, indivíduos não-atópicos (100%) Entretanto, em nosso estudo, uma pequena percentagem de pacientes dos grupos Lm- (20%) e NA (10%) apresentaram níveis de IgG1 específicos a Lm acima do limiar de positividade, mas com nenhuma diferença significativa entre as classes de anticorpos. Esses resultados sugerem que anticorpos IgG1 e IgG4 específicos poderiam estar refletindo uma consequência

natural de uma resposta imune protetora, limitando as reações de hipersensibilidade em pacientes alérgicos. Adicionalmente, em relação à subclasse IgG1, os resultados obtidos nos grupos Lm– e NA estão de acordo com um estudo realizado por Härfast; Van Hage-Hamsten; Lilja (1995), que falhou em detectar anticorpos IgG1 alérgeno-específicos a pólen de bétula (planta arbórea, *Betula verrucosa*) em indivíduos não-atópicos.

Quanto à correlação dos níveis de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos a alérgenos de pólen de Lm, houve uma correlação positiva entre os níveis de IgG1 e IgG4 assim como entre os níveis de IgE e IgG4, indicando que os antígenos derivados de *L. multiflorum* podem estar envolvidos tanto na sensibilização alérgica (IgE) bem como na manutenção da homeostase (IgG1 e IgG4).

Kihlström et al. (2005), ao estudar sensibilização a pólen de bétula, relataram que crianças expostas a altas doses de pólen durante os primeiros 3 meses de vida, mostraram resposta anticórpica IgG4 específica positiva ao alérgeno recombinante de Bet v do grupo 1 (rBet v 1). Além disso, os mesmos autores relataram também que resposta IgE parece ser mais importante no risco da doença atópica que os níveis de IgG4, e eles sugerem que anticorpos IgG4 possam ter um efeito imuno-modulador nos sintomas da rinoconjuntivite alérgica em crianças sensibilizadas ao pólen de bétula. Assim, a doença alérgica é freqüentemente associada a uma resposta anticórpica a alérgenos comuns, principalmente devido às imunoglobulinas dos isotipos IgE e IgG, e a distribuição das subclasses de IgG depende da natureza do alérgeno sensibilizante (BOLUDA; LA CUADRA; BERRENS, 1996).

Extratos alergênicos de pólen de *Lm* devem ser preparados empregando-se métodos de extração adequados para a obtenção de alérgenos de referência com composição conhecida e reprodutível, e com uma potência biológica definida. Estudos mais detalhados serão necessários para avaliar a composição do extrato Lm_{PBS} , com relação a seus alérgenos principais e sua eficiência, sendo que o processo de padronização será fundamental para preparar extratos de pólen de *L. multiflorum* com alérgenos de interesse que possam ser aplicados no diagnóstico e na terapêutica da doença polínica em análises tanto *in vivo* quanto *in vitro*

6. CONCLUSÕES

- Dentre os três extratos obtidos (Lm_{PBS} , Lm_{e-PBS} e $Lm_{NH_4HCO_3}$), o extrato Lm_{PBS} mostrou ser mais eficaz em detectar anticorpos IgE a alérgenos de pólen de Lm em pacientes com polinose;
- Os três extratos apresentaram correlação positiva entre os níveis de anticorpos IgE específicos a alérgenos de pólen de Lm;
- O extrato Lm_{PBS} utilizado no teste cutâneo de puntura foi adequado em avaliar a sensibilização alérgica ao pólen de *L. multiflorum* em pacientes com polinose, sendo capaz de diferenciar os grupos Lm+ dos grupos Lm– e NA;
- Os níveis médios de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos ao pólen de *L. multiflorum* foram maiores nos pacientes com polinose, apresentando correlação entre os níveis de IgG1 e IgG4 e IgE e IgG4, sugerindo a importância dos antígenos presentes no extrato de pólen *L. multiflorum* tanto na sensibilização quanto na manutenção da homeostase em pacientes com polinose.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AALBERSE, R. C.; VAN DER GAAG, R.; VAN LEEUWEN, J. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 130, n. 2, p. 722-726, 1983.

AALBERSE, R. C.; VAN MILLIGEN, F.; TAN, K.Y.; STAPEL, S. O. Allergen-specific IgG4 in atopic disease. **Allergy**, Copenhagen, v. 48, n. 8, p. 559-569, 1993.

AALBERSE, R. C.; SCHUURMAN, J.; VAN REE, R.; STAPEL, S. IgG4 antibody assays in allergy diagnosis. **Research in Immunology**, Amsterdam, v. 149, p. 263-266, 1998.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5 ed. Philadelphia: Saunders, 2003, 562 p.

ARILA, M. C.; IBARROLA, I.; ERASO, E.; AGUIRRE, M.; MARTÍNEZ, A.; ASTURIAS, J. A. Quantification in mass units of group 1 grass allergens by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 1271-1278, 2001.

ARRUDA, L. K.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; BAGGIO, D.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; NASPITZ, C. K. Exposure and sensitization to house dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 433-439, 1991.

BASS, D. J.; DELPECH, V.; BEARD, J.; BASS, P.; WALLS, R. S. Late summer and fall (March-May) pollen allergy and respiratory disease in Northern New South Wales, Australia. **Annals of Allergy and Asthma Immunology**, Arlington, v. 85, n. 5, p. 374-381, 2000.

BEHRENDT, H.; BECKER, W. M. Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 13, n. 6, p.709-715, 2001.

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

BEHRENDT, H.; BECKER, W. M.; FRITZSCHE, C.; SLIWA-TOMCZOK, W.; TOMCZOK, J.; FRIEDRICHS, K. H.; RING, J. Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 113, n. 1-3, p. 69-74, 1997.

BEHRENDT, H.; KASCHE, A.; EBNER VON ESCHENBACH, C.; RISSE, U.; HUSS-MARP, J.; RING, J. Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 124, n. 1-3, p.121-125, 2001.

BOLUDA, L.; LA CUADRA, B.; BERRENS, L. Binding affinities of allergens from pollen, mites, and house dust for specific IgG subclass antibodies. **Allergy**, Copenhagen, v. 51, n. 10, p. 706-711, 1996.

BOUSQUET, J.; LOCKEY, R.; MALLING, H. J. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. **Allergy**, Copenhagen, v. 53, S44, p. 1-42, 1998.

BURTON, M. D.; PAPALIA, L.; EUSEBIUS, N. P.; O'HEHIR, R. E. O.; ROLLAND, J. M. Characterization of the human T cell response to rye grass pollen allergens Lol p 1 and Lol p 5. **Allergy**, Copenhagen, v. 57, n. 12, p. 1136-1144, 2002.

CARNÉS, J.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; BOLUDA, L.; CASANOVAS, M; SASTRE, J.; LLUCH BERNAL, M; BLANCA, M. Rapid release of Ole e 1 from Olive pollen using different solvents. **Allergy**, Copenhagen, v. 57, n. 9, p. 798-804, 2002.

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

CHOWDHURY, I.; CHAKRABORTY, P.; GUPTA-BHATTACHARYA, S.; CHANDA, S. Allergenic relationship among four common and dominant airborne palm pollen grains from Eastern India. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 977-983, 1998.

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

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

DEVEY, M. E.; WILSON, D. V.; WHEELER, A. W. The IgG subclasses of antibodies to grass pollen allergens produced in hay fever patients during hyposensitization. **Clinical Allergy**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 227-236, 1976.

DJURUP, R.; OSTERBALLE, R. IgG subclass antibody response in grass pollen allergic patients undergoing specific immunotherapy. Prognostic value of serum IgG subclass antibody levels early in immunotherapy. **Allergy**, Copenhagen, v. 39, n. 6, p. 433-441, 1984.

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

EBO, D. G.; HAGENDORENS, C. H.; BRIDTS, C. H.; DE CLERCK, L. S.; STEVENS, W. J. Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein profiling: mimickers of allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 137-144, 2004.

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

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

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

GELL, O. G. H.; COOMBS, R. R. A. **Clinical Aspects of Immunology**. 2. ed. Oxford: Blackwell, 1968, p. 575-596.

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

GROTE, M.; VRTALA, S.; NIEDERBERGER, V.; WIERMANN, R.; VALENTA, R.; REICHELT, R. Release of allergen-bearing cytoplasm from hydrated pollen: a mechanism common to a variety of grass (Poaceae) species revealed by electron microscopy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 108, n. 1, p. 109-115, 2001.

HAMMARSTROM, L.; SMITH, C. I. Immunoglobulin subclass distribution of specific antibodies in allergic patients. **Allergy**, Copenhagen, v. 42, n. 7, p. 529-534, 1987.

HÄRFAST, B.; VAN HAGE-HAMSTEN, M.; LILJA, G. Birch pollen allergens fail to evoke IgG1 responses in non-atopic individuals. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 223-224, 1995.

HASSIM, Z.; MARONESE, S. E.; KUMAR, R. K. Injury to murine airway epithelial cells by pollen enzymes. **Thorax**, London, v. 53, n. 5, p. 368-371, 1998.

HERRICK, C. A.; BOTTOMLY, K. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 3, n. 5, p. 405-412, 2003.
HOLT, P. G. Macrophage: dendritic cell interaction in regulation of the IgE response in asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 4-6, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2004. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>>. Acesso em: 02 fev. 2006.

INTERNATIONAL STUDY OF ASTHMA AND ALLERGIES IN CHILDHOOD - ISAAC. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema. ISAAC. Steering Committee. **Lancet**, London, v. 351, n. 9111, p. 1225-1232, 1998.

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

JUTEL, M.; JAEGER, L.; SUCK, R.; MEYER, H.; FIEBIG, H.; CROMWELL, O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 116, n. 3, p. 608-613, 2005.

KENEMY, D. M.; URBANEK, R.; EWAN, P.; MCHUGH, S.; RICHARDS, D.; PATEL, S.; LESSOF, M. H. The subclass of IgG antibody in allergic disease: II. The IgG subclass of antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 545-549, 1989.

KIHLSTRÖM, A.; HEDLINW, G.; PERSHAGENZ, G.; TROYE-BLOMBERG, M.; HÄRFÄSTZ, B.; LILJAZ, G. Immunoglobulin G4-antibodies to rBet v 1 and risk of sensitization and atopic disease in the child. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 35, n. 12, p. 1542-1549, 2005.

KNOX, R. B. **Pollen and allergy**. London: Edward Arnold Limited, 1979, 60 p.

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

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

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

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

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

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

MITMAN, G. A history of pollen mapping and surveillance: the relations between natural history and clinical allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 114, n. 5, p.1230-1235, 2004.

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

MONN, C.; KOREN, H. S. Bioaerosols in ambient air particulates: a review and research needs. **Reviews on Environmental Health**, Tel Aviv, v. 14, n. 2, p. 79-89, 1999.

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

NELSON, H. S. The use of standardized extracts in allergen immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 106, n. 1, p. 41-45, 2000.

PEREZ, M.; ISHIOKA, G. Y.; WALKER, L. E.; CHESNUT, R. W. cDNA cloning and immunological characterization of the rye grass allergen Lol p 1. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 265, n. 27, p. 16210-16215, 1990.

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

PLATTS-MILLS, T.; VAUGHAN, J.; SQUILLACE, S.; WOODFOLK, J.; SPORIK, R. Sensitization, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. **Lancet**, London, v. 357, n. 9258, p. 752-756, 2001.

PERZANOWSKI, M. S.; RONMARK, E.; PLATTS-MILLS, T. A.; LUNDBACK, B. Effect of cat and dog ownership on sensitization and development of asthma among preteenage children. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 166, n. 5, p. 696-702, 2002.

PREFEITURA MUNICIPAL DE CAXIAS DO SUL, 2006. Disponível em: <http://www.caxias.rs.gov.br/cidade/cid_dge2.php4>. Acesso em: 05 fev. 2006.

QUIRALTE, J.; FLORIDO, F.; ARIAS DE SAAVEDRA, J. M.; GOMEZ, A.; SAENZ DE SAN PEDRO, B.; GONZALEZ, E.; RODRÍGUEZ, R. Olive allergen-specific IgE responses in patients with *Olea europaea* pollinosis. **Allergy**, Copenhagen, v. 57, S. 71, p. 47-52, 2002.

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

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

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

ROBINSON, C.; KALSHEKER, N. A.; SRINIVASAN, N.; KING, C. M.; GARROD, D. R.; THOMPSON, P. J.; STEWART, G. A. On the potential significance of the enzymatic activity of mite allergens to immunogenicity. Clues to structure and function revealed by molecular characterization. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 27, n.1, p.10-21, 1997.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Editora Manole, 1999, p. 301-302.

ROMAGNANI, S. The Th1/Th2 paradigm. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 18, n. 6, p. 263-266, 1997.

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

ROSSI, R. E.; MONASTEROLO, G.; DIANA, A.; MONASTEROLO, S.; DELUCCHI, M. Evaluation of recombinant and native timothy pollen (rPhl p 1, 2, 5, 6, 7, 11, 12 and nPhl p 4)-specific IgG4 antibodies induced by subcutaneous immunotherapy with timothy pollen extract in allergic patients. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 135, n. 1, p. 44–53, 2004.

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

SCHÄFER, T.; HOELSCHER, B.; ADAM, H.; RING, J.; WICHMANN, H. E.; HEINRICH, J. Hay fever and predictive value of prick test and specific IgE antibodies: a prospective study in children. **Pediatric Allergy and Immunology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 120-129, 2003.

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

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

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

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

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

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

VAN DER GIESSEN, M.; HOMAN, W. L.; VAN KERNEBEEK, G.; AALBERSE, R. C.; DIEGUES, P. H. Subclass typing of IgG antibodies formed by grass pollen-allergic patients during hyposensitization. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 50, n. 5, p. 625-640, 1976.

VAN REE, R.; VAN LEEWEN, W. A.; AALBERSE, R. C. How far can we simplify in vitro diagnostic for grass pollen allergy? A study with 17 whole pollen extracts and purified natural and recombinant major allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 102, n. 2, p. 184-190, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

WIDMER, F.; HAYES, P. J.; WHITTAKER, R. G.; KUMAR, R. K. Substrate preference profiles of proteases released by allergenic pollens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 571-576, 2000.

WITTEMAN, A. M.; STAPEL, S. O.; SJAMSOEDIN, D. H. S.; JANSEN, H. M.; AALBERSE, R. C.; VAN DER ZEE, J. S. Fel d 1-specific IgG antibodies induced by natural exposure have blocking activity in skin tests. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 109, n. 4, p. 369-375, 1996.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

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

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 129/03

Uberlândia, 22 de setembro de 2003.

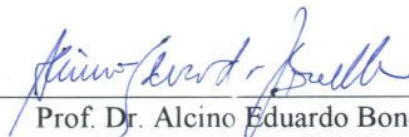
Ilmo(a) Sr.(a).

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

Prezado(a). Professor(a),

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

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


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

ANEXO 2



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica
Campus Umuarama - Bloco 4C - Uberlândia - MG - Brasil - 38.400-902
Telefone: 034-3218-2195 - TELEFAX: 034-3218-2333

TERMO DE CONSENTIMENTO

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

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

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

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

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

_____, ____ de _____ de 200__.

ASSINATURA

TESTEMUNHA