



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Análise da resposta de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específica a antígenos derivados de grãos de pólen de *Lolium multiflorum* por ELISA e *immunoblotting* e diagnóstico de alergia por *microarray* de alérgenos em pacientes com polinose

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

Priscila Ferreira de Sousa Moreira

Uberlândia
Agosto - 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Análise da resposta de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específica a antígenos derivados de grãos de pólen de *Lolium multiflorum* por ELISA e *immunoblotting* e diagnóstico de alergia por *microarray* de alérgenos em pacientes com polinose

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

Priscila Ferreira de Sousa Moreira

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Orientador

Uberlândia
Agosto - 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- M838a Moreira, Priscila Ferreira de Sousa, 1981-
2010 Análise da resposta de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específica a
 antígenos derivados de grãos de pólen de *Lolium multiflorum* por ELISA
 e *immunoblotting* e diagnóstico de alergia por *microarray* de alérgenos
 em pacientes com polinose / Priscila Ferreira de Sousa Moreira. – 2010.
 111 p. : il.
- Orientador: Ernesto Akio Taketomi.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
 Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. Alérgenos - Teses. 3. Pólen – Teses. 4. Aler-
 gia - Teses. I. Taketomi, Ernesto Akio. II. Universidade Federal de Uber-
 lândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Aos meus pais,
Samuel e Hiléia

“Concede-me, Senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar aquelas que posso e sabedoria para distinguir umas das outras – vivendo um dia de cada vez, desfrutando um momento de cada vez, aceitando as dificuldades como um caminho para alcançar a paz, considerando o mundo pecador como ele é, e não como eu gostaria que ele fosse, confiando em Deus para endireitar todas as coisas para que eu possa ser moderadamente feliz nesta vida e sumamente feliz Contigo na eternidade.”

Reinhold Niebuhr

Agradecimentos

Agradeço especialmente a *Deus*, por conceder a cada amanhecer o presente da vida;

Às minhas irmãs, *Mariana* e *Daniela* por me fazer compreender o valor do amor fraterno, da amizade incondicional, e pelo apoio e incentivos constantes;

Ao meu namorado *Alexandre*, pela paciência, amor, compreensão, nesses últimos meses de muito trabalho;

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi*, pela orientação e confiança depositada em mim, contribuindo para meu crescimento acadêmico e científico;

À *Profa. Dra. Mônica Camargo Sopelete*, pelos ensinamentos, apoio, incentivo, amizade, durante todos esses anos de convivência tanto de perto, quanto de longe;

À *Prof. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva*, pela disposição em ajudar e ensinar, contribuindo para o enriquecimento de nossos trabalhos.

Ao *Prof. Francisco de Assis Machado Vieira*, pela imprescindível contribuição no estudo, compartilhando conosco a história de seus pacientes com polinose, sem os quais nada poderia ser feito;

Aos grandes amigos *Karine, Rafael, Leandro* e *Núbia*, pessoas cuja amizade alimenta a esperança de que tudo vai dar certo;

Aos amigos dos Laboratório de Alergia e Imunoparasitologia: *Laura, Bia, Juliana, Cristiane, Jorge, Gesmar, Ana Carolina, Isabella, Danielle, Daniela, Bárbara, Bôscollí, Fernando, Ronaldo, Meimei, Ana Cláudia, Cristina, Celene, Hercílio, Silas, Mariana, Fernanda...* e a todos os demais que já passaram ou que estão chegando, pelos momentos de convivência no laboratório e pelas trocas de experiências e conhecimentos;

Aos pesquisadores, *Dra Katharina Gangl, Profa Dra Verena Niederberger e Prof Dr. Rudolf Valenta*, da Universidade de Medicina de Viena, por terem me recebido em seus laboratórios e contribuído para o aprimoramento deste trabalho.

Aos professores *Profa. Dra. Neide Maria da Silva, Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior* e *Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva*, pelas sugestões na banca de qualificação, contribuindo para o melhoramento do trabalho;

Aos membros da banca examinadora, *Prof. Dr. Régis de Albuquerque Campos, Profa. Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso, Profa. Dra. Neide Maria da Silva* e *Prof. Dr. Gesmar Rodrigues Silva Segundo*, pela aceitação e disponibilidade em compor a banca examinadora;

A todos os funcionários e pesquisadores dos Laboratórios de Alergia e Imunoparasitologia, pela disposição em ajudar sempre que necessário;

Às secretárias *Luzeleide* e *Lucélia* pela disposição em nos ajudar, esclarecendo nossas constantes dúvidas;

À *CAPES*, que me proporcionou a experiência de participar do Programa de Doutorado no Brasil com Estágio no Exterior (PDEE), contribuindo para minha formação científica;

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

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Lista de abreviaturas e siglas

χ^2	Qui-quadrado
ABTS	2'2'-azínbis-3-etíyl-benzthiazóline sulfonic acid
Apud	Citado por
BSA	soroalbumina bovina
CD	Marcador do tipo <i>Cluster of Differentiation</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DO	Densidade óptica
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
et al.	<i>Et alii</i> (e outros)
F	Feminino
G	força relativa da gravidade
IE	Índice ELISA
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina G de subclasse 1
IgG4	Imunoglobulina G de subclasse 4
IL	Interleucina
ISAC®	<i>Immuno-Solid phase Allergen Chips</i> , ISAC® – Phadia, VBC Genomics
ISAAC	Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância (<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>)
I.U.I.S	União Internacional das Sociedades de Imunologia (<i>International Union of Immunology Societies</i>)
ISU	<i>ISAC Standardized Units</i> – Unidades padronizadas de ISAC®
kDa	Kilodaltons
Lam.	Lamarck
Lm	<i>Lolium multiflorum</i>
Lm _{H2O}	extrato bruto de pólen de Lm obtido pela extração em água
Lm _{PBS}	extrato bruto de pólen de Lm obtido pela extração em PBS
Lm+	grupo de pacientes com polinose e TCP positivo a extrato de Lm
M	Masculino
Mr	Massa molecular relativa
N	Número de indivíduos
NA	Grupo de indivíduos não atópicos
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	PBS adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	PBS adicionada de Tween 20 e BSA
PBS-T-M	PBS adicionada de Tween 20 e leite em pó desnatado
Phl p 6251	Molécula híbrida contendo epítomos dos quatro principais alérgenos de <i>Phleum pratense</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl</i> (Fenilmetilsulfonil)
r	Coefficiente de correlação
RAST	<i>Radio Allergo Sorbent Test</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliácridamida na presença de SDS (<i>SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
TCP	Teste cutâneo de puntura
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
Treg	Linfócito T regulador
Tris	Hidroximetil-aminometano
Tween 20	Monolaurato de Polioxietileno Sorbitano (<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i>)

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos dos pacientes com polinose e teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a extrato de pólen de <i>Lolium multiflorum</i> (Lm _{PBS}) (Lm+) e de indivíduos não atópicos (NA).	58
Tabela 2. Características demográficas, sintomas clínicos e resultado de teste cutâneo de puntura (TCP) (positividade, %) dos 78 pacientes com polinose e 5 pacientes alérgicos a ácaros da poeira domiciliar (controle).	66
Tabela 3. Presença de alérgenos dos grupos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 12 e 13 nos extratos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i> (Lm _{H2O}) e <i>Phleum pratense</i> determinado por <i>westernblotting</i> utilizando anticorpos específicos produzidos contra cada grupo de alérgenos. MW: peso molecular.	69
Tabela 4. Características dos 50 alérgenos reconhecidos por 78 pacientes com polinose.	76

Lista de figuras

Figura 1. Níveis de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos a alérgenos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i> , obtidos através de ELISA e expressos em Índice ELISA (IE) em 33 amostras de soros de pacientes com TCP positivo a Lm (grupo Lm+) e 10 amostras de soros de indivíduos não atópicos (grupo NA).	60
Figura 2. Correlação entre os níveis de anticorpos IgG1 e IgE (A), IgG4 e IgE (B) e entre os níveis de IgG1 e IgG4 (C) específicos a antígenos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i> obtidos por ELISA e expressos em Índice ELISA (IE) no grupo Lm+ (n=33).	61
Figura 3. (A) Perfil eletroforético (SDS-PAGE gradiente 8-18%) do extrato de <i>Lolium multiflorum</i> (Lm _{PBS}). (B) <i>Immunoblotting</i> representativo para a reatividade a anticorpos IgE (1), IgG1(2) e IgG4(3) no soro de 3 pacientes do grupo Lm+ (I, II e III) e 2 pacientes do grupo NA (IV e V).	63
Figura 4. Frequência percentual de reconhecimento dos componentes antigênicos do extrato de pólen de <i>Lolium multiflorum</i> por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 no soro de pacientes com polinose (Lm+) (A) e indivíduos não atópicos (NA) (B).	64
Figura 5. Perfil eletroforético dos extratos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i> (Lm _{H₂O}) e <i>Phleum pratense</i> em SDS-PAGE a 15%, corados por <i>coomassie brilliant blue</i> .	68
Figura 6. Inibição da ligação de IgE por ELISA, ao extrato de <i>Lolium multiflorum</i> (eixo y), expresso em porcentagem após a pré-adsorção dos soros do grupo polinose (n = 78) com extrato de pólen de <i>Lolium multiflorum</i> , extrato de pólen de <i>Phleum pratense</i> ou com a molécula híbrida carreadora dos quatro principais alérgenos de pólen da gramínea <i>Phleum pratense</i> : Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 e Phl p 6 (eixo x).	70
Figura 7. <i>Immunoblotting</i> de inibição da ligação de anticorpos IgE séricos aos extratos de <i>Lolium multiflorum</i> e <i>Phleum prantense</i> . Sem inibidor (1); após inibição com: extrato de pólen de <i>Lolium multiflorum</i> (2), extrato de pólen de <i>Phleum pratense</i> (3), mistura de alérgenos purificados Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 e Phl p 6 (4), ou mistura de alérgenos Phl p 4 e Phl p 12 purificados (5).	72
Figura 8. Frequência de reconhecimento alérgênico por IgE sérica de 78 pacientes alérgicos a pólen de gramíneas.	75
Figura 9. Níveis de IgE específica aos alérgenos de pólen de gramíneas, expressos em ISU (ISAC <i>Standardized Units</i> – Unidades padronizadas de ISAC®).	77
Quadro 1. Gramíneas da família Poaceae e sua hierarquia filogenética. O Gênero foi omitido com objetivo de simplificação. Nome comum apresentado refere-se ao nome conhecido em algumas regiões do Brasil. Adaptado de Lovborg et al. (1999).	28
Quadro 2. Classificação dos alérgenos de pólen de gramíneas. Adaptado: União Internacional das Sociedades de Imunologia, I.U.I.S (www.allergen.org); Allergome (www.allergome.com); Mohapatra; Lockey; Shirley (2005); Anderson; Lindholm (2003).	32

Sumário

	Página
Lista de abreviaturas e siglas	6
Lista de tabelas	7
Lista de figuras	8
Resumo	12
Summary	13
1 Introdução	14
1.1 Alergia e atopia	15
1.2 Alergia e anticorpos IgE na resposta imune alérgica	17
1.3 Anticorpos IgG na resposta imune alérgica	20
1.4 Diagnóstico das doenças alérgicas	21
1.5 Polinose	24
1.6 Polinose no Brasil e no mundo	26
1.7 Grãos de pólen e alérgenos	28
1.8 Alérgenos de pólen de gramíneas	30
1.9 Reatividade cruzada entre alérgenos de pólen de gramíneas da família Poaceae	34
1.10 Grãos de pólen alergênicos no Brasil	36
1.11 <i>Lolium multiflorum</i>	37
2 Objetivos	39
3 Material e Métodos	41
3.1 Aspectos éticos	42
3.2 Avaliação clínica e seleção dos pacientes e indivíduos atópicos do estudo	42
3.3 Análises estatísticas	44
3.4 Normas de biossegurança	44
Estudo I - Avaliação da resposta IgE, IgG1 e IgG4 específica a alérgenos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i>	45
Pacientes	45
Obtenção de grãos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i>	45
Extração antigênica	46
Teste cutâneo de puntura	46
Coleta de sangue	47
Ensaio imunoenzimático – ELISA – para detecção de IgE sérica específica a alérgenos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i>	47
Ensaio imunoenzimático – ELISA – para detecção de IgG1 e IgG4 específicos a alérgenos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i>	49
Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	50
Immunoblotting para detecção de frações antigênicas de pólen de <i>Lolium multiflorum</i> ligantes de IgE, IgG1 e IgG4	51

Estudo II - Uso de micro arranjos de alérgenos para o diagnóstico por componentes definidos em pacientes alérgicos a pólen de gramíneas e ensaios de inibição para avaliação da reatividade cruzada entre extratos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i> e <i>Phleum pratense</i>	52
Pacientes	52
Preparação dos extratos alergênicos	52
<i>Westernblotting</i> para detecção dos grupos de alérgenos nos extratos naturais de pólen	53
Experimentos de ELISA de inibição	53
Ensaio de <i>immunoblotting</i> de inibição	54
<i>Microarray</i> baseado em alérgenos recombinantes e naturais para avaliação do perfil de reatividade IgE	55
4 Resultados	56
Estudo I - Avaliação da resposta IgE, IgG1 e IgG4 específica a alérgenos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i>	57
Características dos pacientes do estudo	57
Quantificação de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 séricos específicos a antígenos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i>	59
Análise eletroforética e reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 a componentes do extrato de pólen de <i>Lolium multiflorum</i>	62
Estudo II - Uso de micro arranjos de alérgenos para o diagnóstico por componentes definidos em pacientes alérgicos a pólen de gramíneas e ensaios de inibição para avaliação da reatividade cruzada entre extratos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i> e <i>Phleum pratense</i>	65
Características dos pacientes do estudo	65
Caracterização alergênica e reatividade cruzada entre os extratos de pólen de <i>Lolium multiflorum</i> , <i>Phleum pratense</i> e molécula híbrida (Phl p 6251)	67
Perfil de reatividade cruzada de IgE aos extratos de <i>Lolium multiflorum</i> e <i>Phleum pratense</i> por <i>immunoblotting</i>	71
Perfil de reatividade IgE por <i>microarray</i> de alérgenos definidos	73
5 Discussão	78
6 Conclusões	89
Referências Bibliográficas	91
Anexos	109
Anexo 1	110
Anexo 2	111

Resumo

O pólen da gramínea *Lolium multiflorum* é considerado a principal fonte alergênica para a alergia a pólen de gramíneas na região sul do Brasil. A sensibilização dos pacientes alérgicos a pólen de gramíneas a moléculas de alérgenos individuais ainda não foi avaliada. Os objetivos deste trabalho foram no estudo I: avaliar a reatividade de IgE, IgG1 e IgG4 aos componentes do extrato de pólen de *Lolium multiflorum* em pacientes com polinose; e no estudo II: avaliar a reatividade cruzada entre alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum* e *Phleum pratense* e a analisar a reatividade IgE por meio de *microarray* de alérgenos.

Para o estudo I, extrato de pólen de *Lolium multiflorum* foi preparado e analisado por SDS-PAGE. Amostras de soro de 33 pacientes com alergia a pólen de gramíneas (Lm+) e 10 indivíduos não-atópicos (NA) foram testadas para a reatividade IgE, IgG1 e IgG4 por ELISA e *immunoblotting*. No estudo II, foram analisadas 78 amostras (incluindo os 33 do estudo I) de soro de pacientes com alergia a pólen de gramíneas (grupo polinose) e 5 amostras de soro de pacientes alérgicos a ácaros da poeira domiciliar (controle). Para investigar o nível de reatividade cruzada, foram realizados experimentos de ELISA e *immunoblotting* de inibição com extratos de *Lolium multiflorum* e *Phleum pratense*. A presença de anticorpos IgE específicos para 103 alérgenos purificados naturais e recombinantes foi investigada por *microarray* de alérgenos.

No estudo I, os níveis de anticorpos IgE e IgG4 foram significativamente maiores no grupo Lm+, que apresentou níveis médios de anticorpos IgE significativamente maiores que os níveis de IgG1 ($p < 0,0001$) e IgG4 ($p < 0,01$). Correlações positivas foram encontradas principalmente entre os níveis de anticorpos IgE e IgG4 ($r_s = 0,61$; $p = 0,0001$), com associação duplo positiva de 79% e simples positiva de 21% apenas para IgE. Por SDS-PAGE, foram visualizadas frações protéicas variando de 10 a 101 kDa. No grupo Lm+, os componentes protéicos mais frequentemente reconhecidos (>50%) por anticorpos IgE foram: 10, 20, 24, 26, 29, 32, 35, 37, 47, 54 e 57 kDa; por anticorpos IgG1: 10, 24, 26, 29, 32, 54, 57 e 71 kDa; e por anticorpos IgG4: 26, 29, 32, 54 e 57 kDa. No grupo NA, houve reatividade apenas para anticorpos IgG4 (inferior a 50%) nas frações protéicas de 29, 32, 37, 54 e 57 kDa, e para anticorpos IgG1 (>50%) nas frações de 29, 32, 54 e 71 kDa. No estudo II, dentro da população de pacientes alérgicos a pólen de gramíneas, os alérgenos mais frequentemente reconhecidos foram Phl p 1 (95%), Cyn d 1 (85%), Phl p 5 (82%), Phl p 2 (76%), Phl p 4 (64%) e Phl p 6 (45%). A maioria dos pacientes estava sensibilizada apenas a alérgenos de pólen de gramíneas. Um alto grau de reatividade cruzada foi encontrado entre *Lolium multiflorum* e *Phleum pratense*. Os resultados de *immunoblotting* mostraram que IgE sérica reconheceu principalmente alérgenos de *L. multiflorum* e o extrato de *P. pratense* não inibiu completamente a ligação da IgE sérica aos alérgenos de pólen de *L. multiflorum*.

Concluindo, componentes antigênicos presentes no extrato de pólen de *Lolium multiflorum* são capazes de induzir uma resposta IgE, IgG1 e IgG4 em pacientes com polinose, além de resposta IgG1 e IgG4 em pacientes não atópicos, porém em níveis menores. Componentes antigênicos de 26, 29 e 32 kDa foram reconhecidos por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 em pacientes com polinose, com maior frequência para anticorpos IgE e IgG4. O diagnóstico por *microarray* de componentes definidos de alérgenos revelou um perfil de reconhecimento IgE compatível com uma mono-sensibilização preferencial a alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum*. Um alto grau de reatividade cruzada entre alérgenos de extrato de pólen de *Phleum pratense* e *Lolium multiflorum* foi observado sugerindo que o diagnóstico de alergia possa ser realizado com alérgenos de *Phleum pratense* dentro da população estudada.

Palavras-Chave: alergia a pólen de gramíneas, *Lolium multiflorum*, IgE, IgG1, IgG4, reatividade cruzada, *Phleum pratense*, *microarray* de componentes alergênicos definidos.

Summary

In Southern Brazil, *Lolium multiflorum* pollen is thought to be the most important source for grass pollen allergy. The sensitivity of Brazilian grass pollen allergic patients to individual allergen molecules has not been analyzed yet. The aims of this work were, in the study I: to evaluate the IgE, IgG1 and IgG4 reactivity to the components of *L. multiflorum* pollen extract in grass pollen allergic patients; and in the study II: to evaluate the cross-reactivity between allergens from *Lolium multiflorum* and *Phleum pratense* pollen extracts and to use micro-arrayed allergen molecules to characterize IgE reactivity in Brazilian grass pollen allergic patients.

In the study I, extract from *Lolium multiflorum* pollen was prepared and analyzed by SDS-PAGE. Serum samples from 33 patients with grass pollen allergy (Lm+) and 10 non atopic individuals (NA) were tested to the IgE, IgG1 and IgG4 reactivity by ELISA and immunoblotting. In the study II, sera from 78 grass pollen allergic patients and from 5 patients allergic to house dust mites (controls) were analyzed. To investigate the level of cross-reactivity, ELISA and immunoblotting inhibition experiments with *Lolium multiflorum* and *Phleum pratense* extracts were performed. The presence of IgE antibodies specific for 103 purified natural and recombinant allergens was investigated using allergen chips.

In the study I, levels of IgE and IgG4 were significantly higher in the Lm+ group that showed IgE levels significantly higher than IgG1 ($p < 0,0001$) and IgG4 ($p < 0,01$). Positive correlations were observed mainly between levels of IgE and IgG4 ($r_s = 0,61$; $p = 0,0001$), with double positive association of 79% and single positive of 21% only to IgE. By SDS-PAGE, protein fractions were visualized in the range of 10 to 101 kDa. In the Lm+ group, the immunodominant components (>50%) for IgE were: 10, 20, 24, 26, 29, 32, 35, 37, 47, 54 and 57 kDa; for IgG1: 10, 24, 26, 29, 32, 54, 57 and 71 kDa; and for IgG4: 26, 29, 32, 54 and 57 kDa. In the NA group, reactivity was observed only to IgG4 (less than 50%) in the protein fractions of 29, 32, 37, 54 and 57 kDa, and for IgG1 (>50%) in the fractions of 29, 32, 54 and 71 kDa. In relation to study II, within the Brazilian grass pollen allergic patients, the most frequently recognized allergens were Phl p 1 (95%), Cyn d 1 (85%), Phl p 5 (82%), Phl p 2 (76%), Phl p 4 (64%) and Phl p 6 (45%). Most patients were sensitized only to grass pollen allergens. A high degree of IgE cross-reactivity between *Phleum pratense* and *Lolium multiflorum* was found. Immunoblotting results showed that serum IgE recognized mainly *L. multiflorum* allergens and *P. pratense* extract did not completely inhibit serum IgE binding to *L. multiflorum* allergens.

In conclusion, antigenic components from *Lolium multiflorum* pollen extract are able to induce IgE, IgG1 and IgG4 responses in grass pollen allergic patients, and also IgG1 and IgG4 responses in non atopic patients, but in lower levels. Antigenic components of 26, 29 and 32 kDa were recognized by IgE, IgG1 and IgG4 antibodies in patients with grass pollen allergy, in a higher frequency to IgE and IgG4. Component-resolved analysis of sera from Brazilian grass pollen allergic patients reveals an IgE recognition profile compatible with a preferential mono-sensitization to *Lolium multiflorum* pollen allergens. Due to the high degree of cross-reactivity between *Phleum pratense* and *Lolium multiflorum* allergens it seems that diagnosis can be achieved with timothy grass pollen allergens in the studied population.

Key Words: grass pollen allergy, *Lolium multiflorum*, IgE, IgG1, IgG4, cross-reactivity, *Phleum pratense*, component-resolved diagnosis.

1 Introdução

1.1 Alergia e Atopia

O termo alergia foi empregado primeiramente por Clemens von Pirquet juntamente com Béla Schick em 1906, em estudo sobre a doença do soro. Von Pirquet sugeriu o termo alergia de “*allos*” significando “outro” ou uma derivação do estado original (VON PIRQUET; SCHICK, 1906 apud SIMONS, 1994). Empregado como sinônimo de hipersensibilidade imediata, é utilizado para designar uma reação desencadeada por mecanismos imunológicos mediados por anticorpos, particularmente o isotipo IgE, e por células responsáveis pelas manifestações clínicas devido à exposição a um determinado estímulo em dose tolerada por indivíduos saudáveis (JOHANSSON et al., 2004).

Johansson et al. (2001) classificam a hipersensibilidade em 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, e que desenvolvem sintomas como asma, rinoconjuntivite ou dermatite atópica são considerados indivíduos atópicos (JOHANSSON et al., 2001).

Coca e Cooke, em 1923, empregaram primeiramente o termo atopia, sendo utilizado 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).

A atopia representa uma predisposição genética a doenças alérgicas devido a uma maior susceptibilidade de desenvolver respostas exacerbadas de anticorpos IgE a alérgenos

ambientais comuns, frequentemente proteínas. Os indivíduos que respondem a estímulos provocados pela exposição aos diferentes alérgenos, por meio da produção de altos níveis de IgE são designados atópicos (JOHANSSON et al., 2004). O estado atópico é reconhecido por teste cutâneo, no qual ocorre a desgranulação 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).

As manifestações clínicas das doenças alérgicas podem ser listadas como dermatite atópica, rinite, asma dentre outras, sendo que as doenças respiratórias como a asma e a rinite se destacam devido ao considerável aumento da prevalência nos últimos 20-30 anos com taxas variando de 5% a 30% em países industrializados (ISAAC, 1998; SLY, 1999; ASHER et al., 2006; HOLGATE; POLOSA, 2008). Várias hipóteses têm sido levantadas para justificar o crescimento acelerado da prevalência de alergia em países ocidentais, tidos como países de sociedade moderna, dentre elas, destacam-se a influência de fatores químicos, físicos, biológicos e o ambiente psicossocial, como fatores causadores e adjuvantes, além de outros que podem interferir no processo de desenvolvimento da alergia, como a predisposição genética, por meio da sensibilização alérgica, levando à hiperresponsividade aérea e cutânea, e finalmente à manifestação da doença alérgica (RING et al., 2001).

Em 1998, um estudo feito pelo comitê *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* adotando um questionário padronizado (ISAAC), revelou que os mais altos índices de prevalência da doença alérgica foram encontrados na Austrália, Nova Zelândia, Reino Unido, Estados Unidos e algumas cidades da América Latina. Ao contrário, os índices mais baixos foram encontrados em países não industrializados e áreas tipicamente rurais.

Sabe-se que o microambiente e o estilo de vida contemporâneo contribuem significativamente para o desenvolvimento destas doenças, uma vez que a permanência das pessoas por várias horas em ambientes domésticos, escolares ou ocupacionais, nos quais está presente a maioria dos potenciais alérgenos, implica em maior sensibilização dos indivíduos (PLATT'S-MILLS et al., 1997; PERFETTI et al., 2004; HESSELMAR et al., 2005). Assim, destaca-se uma série de fatores que levam ao desenvolvimento e ao aumento da prevalência de doenças alérgicas, resultado de uma interação de predisposição genética e exposição aos alérgenos, e também a provável associação de alguns cofatores como influência psico-social,

diminuição da estimulação do sistema imune (hipótese da higiene), poluição ambiental dentre outros, os quais podem contribuir de maneira relevante no desencadeamento das respostas alérgicas (RING et al., 2001; BARNES; MARSH, 1998).

Em pacientes não tratados, a alergia pode progredir de moderada a grave e até manifestações de asma, que podem colocar em risco a vida do paciente. Os sintomas da alergia são causados pelo reconhecimento de anticorpos IgE de antígenos ambientais comuns e a subsequente ativação do sistema imunológico, tanto inato, quanto adaptativo, levando à inflamação grave. Embora os sintomas da inflamação alérgica possam ser aliviados com medicamentos, a vacinação alérgeno-específica – imunoterapia – representa o único tratamento que previne a progressão da doença (LINHART et al., 2005).

1.2 Alergia e anticorpos IgE na resposta imune alérgica

As doenças alérgicas são causadas por reações imunológicas a alérgenos, que são substâncias capazes de induzir e reagir com anticorpos IgE específicos que, em alguns indivíduos, são suficientemente fortes para serem associadas com evidência clínica de respostas de hipersensibilidade imediata (SOLOMON; PLATT'S-MILLS, 1993; CROMWELL, 1997).

A sensibilização a alérgenos depende da genética individual, além dos níveis de alérgenos aos quais o indivíduo é exposto, e também do tempo de exposição (SEGUNDO et al., 2009). Sabe-se que a exposição a alérgenos provenientes de ambientes internos pode produzir sintomas em pacientes com asma, rinite e eczema. Arruda e colaboradores (2001) apontam que a exposição a altos níveis de alérgenos de barata em ambientes domésticos é um importante fator de risco para sintomas em indivíduos alérgicos. Muito se tem conjecturado a respeito das condições de exposição aos alérgenos no desencadeamento das respostas alérgicas e como determinados alérgenos tem a propriedade de levar a estas respostas em determinado período e não a uma resposta imunológica dentro da normalidade ou mesmo tolerogênica (TRAIDL-HOFFMANN; JAKOB; BEHRENDT, 2009).

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 alérgenos 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).

Durante a sensibilização, os alérgenos são processados por digestão proteolítica no interior das células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cell* – APC) e os fragmentos peptídicos resultantes são apresentados às células T (PETERSEN et al., 2006).

Indivíduos alérgicos apresentam uma resposta de células T do tipo CD4⁺ alérgeno-específica 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. 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). Platts-Mills e colaboradores (2001a; 2001b) propuseram um modelo de resposta Th2 modificada, com a interação de linfócitos T reguladores (Treg) que, por ação da IL-10, secretam e induzem maior produção de IgG4, em resposta à inibição da síntese de IgE.

A polarização de células T para o perfil Th2 foi, por muitos anos, um paradigma no campo das doenças alérgicas. Entretanto, a discussão a respeito do mecanismo de ação de citocinas anteriormente associadas ao perfil Th1, tal como IL-23, e de famílias de IL-17, levou ao delineamento de um novo perfil, denominado Th17. Tal perfil é caracterizado pela liberação de citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22, além de IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) (BETTELLI et al., 2008). A identificação do fator de transcrição ROR γ t (*retinoic acid-related orphan receptor-gamma t*) como controlador da diferenciação destas células reforça a idéia de que as células produtoras de IL-17 representam um perfil complementar de células T *helper* (IVANOV et al., 2006). Um estudo realizado por Kolls, Kanaly e Ramsay (2003) mostra que os níveis de IL-17A se encontram elevados no lavado broncoalveolar, escarro e tecidos pulmonares de pacientes asmáticos. Verificaram também que a gravidade da doença está diretamente relacionada ao aumento desta citocina. Ademais, Lindén, Laan e Anderson (2005) demonstraram que IL-17A e/ou IL-17F podem liderar uma inflamação local, por meio da indução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) e IL-6, além da produção de

quimiocinas CXCL1/Gro- α (*growth-regulated oncogene a*), CXCL2 e CXCL8/IL-8 pelos fibroblastos de brônquios, epitélios e músculos lisos de órgãos e vasos sanguíneos *in vitro*.

A interleucina 25 (IL-25) é uma citocina da família de IL-17 (IL-17F), secretada por basófilos e eosinófilos em pacientes alérgicos e relacionada ao aumento da produção de IgE, bem como a mudanças no perfil histológico em vários tecidos humanos e murinos (FORT et al., 2001; KIM et al., 2002a; HURST et al., 2002; IKEDA et al., 2003; ANGKASEKWINAI et al., 2007; WANG et al., 2007). De acordo com o recente modelo proposto por Wang e Liu (2008), sobre o papel do perfil Th17 no processo alérgico, o reconhecimento do alérgeno pelo epitélio leva à diferenciação de células T produtoras de IL-17, produzindo IL-17A, IL-17F e IL-22, que por sua vez, induzem células estruturais e infiltrados de células da imunidade inata a liberarem citocinas inflamatórias e quimiocinas, como IL-18, Gro- α , TNF- α , IL-6 e IL-1 β , que aumentam a resposta inflamatória na fase aguda. Na fase crônica, eosinófilos, basófilos e mastócitos produzem IL-25, que potencializa a produção de citocinas do perfil Th2, tais como IL-5 e IL-13.

A indução de tolerância nas células T periféricas representa um passo essencial na resposta imune normal frente aos alérgenos (KARAMLOO et al., 2005). Esta tolerância, observada em indivíduos saudáveis e durante processo de imunoterapia com alérgenos, é caracterizada pela indução de células T reguladoras (Treg) tipo 1 e no aumento da capacidade supressora das células CD4+CD25+ (AKDIS et al., 1998; JUTEL et al., 2003; LING et al., 2004). Tal evento é seguido pelo aumento de IgG4 e/ou IgA e diminuição de IgE na fase tardia do tratamento, além da redução de IgE induzida por IL-4, que mostrou ser também efetivo na mudança para IgG4, por meio da indução da expressão do fator de transcrição $\gamma 4$ (AALBERSE et al., 1993; JEANNIN et al., 1998; JUTEL et al., 2003; ROSSI et al., 2007). Em suma, acredita-se que Treg contribui para controlar a resposta imune inflamatória alérgica de vários modos: supressão de células apresentadoras de antígenos indutoras de células T efetoras; supressão de células Th2 e Th1; supressão de mastócitos, basófilos e eosinófilos; supressão da síntese de anticorpos IgE e indução de anticorpos IgG4 (AKDIS; AKDIS, 2007; MEILER et al., 2008; NANDAKUMAR; MILLER; KUMARAGURU, 2009).

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 respostas IgG alérgeno-específicas podem exercer efeitos protetores por pelo menos três mecanismos (FLICKER; VALENTA, 2003): 1. podem suprimir a ativação alérgeno-induzida de mastócitos e as reações imediatas (BALL et al., 1999); 2. podem inibir a apresentação de alérgeno IgE mediada à célula T e a liberação consecutiva de citocinas pró-inflamatórias (VAN NEERVEN et al., 1999); 3. podem atuar como anticorpos bloqueadores inibindo a produção de anticorpos IgE alérgeno-específicos induzidos em células B de memória ou em plasmócitos pelo contato com alérgeno (MOTHES et al., 2003).

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). Platts-Mills e colaboradores (2001), em estudo sobre a sensibilização a alérgenos de gato, verificaram que uma grande proporção de crianças com alta exposição a alérgenos de gato montam uma resposta IgG, incluindo IgG4, sem serem alérgicos ou sem o risco de asma.

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 grãos de pólen de gramíneas, diferindo assim de indivíduos não atópicos, que apresentavam baixos níveis de anticorpos IgG4.

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 Diagnóstico das doenças alérgicas

O diagnóstico da alergia é baseado na história típica de sintomas alérgicos associado aos testes diagnósticos. Testes estes que podem ser *in vivo* (testes cutâneos de puntura – TCP e intradérmico) e/ou *in vitro*, ambos direcionados à detecção de IgE circulante ou ligada às células, e são de grande relevância, pois possibilitam a identificação da sensibilização de pacientes a um painel de alérgenos, constituindo assim ferramentas importantes na rotina clínica (BOUSQUET et al., 2008).

O teste cutâneo de puntura (TCP), baseado na hipersensibilidade imediata, é amplamente empregado, uma vez que demonstra a reação alérgica mediada por IgE, sendo por isto a principal ferramenta diagnóstica utilizada na prática clínica (TURKELTAPUCB; ERGENP, 1989; DREBORG, 1989; BOUSQUET et al., 2008). Apesar do TCP não diagnosticar a doença alérgica, apenas determinar a presença ou ausência de anticorpos IgE alérgeno-específicos importantes na patogênese da doença alérgica, há um alto grau de relação entre os sintomas e o desafio provocativo utilizado no TCP (OWNBY, 1988). Tal método *in vivo* depende da apresentação do alérgeno à IgE alérgeno-específica ligada aos receptores de IgE na superfície dos mastócitos residentes na pele. Com a ligação de uma quantidade suficiente de receptores à IgE e então aos alérgenos, há a agregação dos complexos na superfície celular e, assim, via mecanismos intracelulares, há a liberação de mediadores pré-formados e síntese e liberação de outros mediadores. A presença de mediadores vasoativos leva à formação de eritema e inchaço local. A histamina, o mediador mais prevalente causa coceira no local da puntura, juntamente com vasodilatação e extravasamento plasmático, o que produz a pápula (WILLIAMS, 2008).

Ensaio *in vitro* para a detecção de anticorpos IgE alérgeno-específicos são particularmente úteis quando o teste cutâneo não pode ser empregado devido a doenças cutâneas ou tratamento médico, dermatografismo significativo, ou uso de extrato que possa ter alta probabilidade de induzir uma reação sistêmica no indivíduo a ser testado (PRUSSIN; METCALFE, 2006). Um resultado positivo nos testes cutâneos não é suficiente para o diagnóstico. É necessário ter associação com a clínica do paciente. O princípio geral usado nestes ensaios é detectar IgE sérica ligada ao alérgeno acoplado em uma superfície sólida. Estes ensaios são influenciados por vários fatores, dentre eles a quantidade e qualidade do alérgeno acoplado à superfície sólida, o grau de ligação de IgE não específica e o grau de bloqueio da ligação de IgE alérgeno específica pela IgG alérgeno específica presente no soro testado (PRUSSIN; METCALFE, 2006).

Sabe-se que tanto doenças alérgicas quanto parasitárias, dentre outros fatores, levam ao aumento dos níveis de IgE total no soro. Diante disto, a mensuração de IgE total não é um bom valor preditivo como ferramenta diagnóstica da alergia, sendo assim relevante determinar os níveis de IgE sérica específica aos alérgenos, o que é importante no diagnóstico de pacientes atópicos (BERNSTEIN; STORMS, 1995; MASTRANDREA et al., 1997; SILVA et al., 2001; DYKEWICZ; FINEMAN, 1998).

Níveis de IgE alérgeno-específicos dependem do grau e da duração da exposição, tanto ao próprio alérgeno quanto aos alérgenos que reagem cruzadamente. Em casos de alergia a grãos de pólen, estes níveis chegam ao pico em quatro semanas de exposição durante a estação polínica e gradualmente decrescem até a próxima estação de pólen. Muitos indivíduos apresentam resultados positivos aos alérgenos, mas nenhuma reatividade clínica. Entretanto, como regra geral, quanto mais fortemente positivo o resultado do teste, mais provável o risco de sintomas (PRUSSIN; METCALFE, 2006).

A determinação dos níveis de IgE específica por ELISA e *immunoblotting* na detecção de alérgenos de pólen de gramíneas, particularmente empregando-se o extrato de pólen de *Lolium multiflorum*, tem se mostrado como uma ferramenta útil na avaliação da resposta de IgE a alérgenos de pólen de *L. multiflorum* em pacientes com polinose (SOPELETE et al., 2006). Entretanto, o uso de extrato alergênico específico define a fonte a qual o alérgeno pertence, porém não identifica as moléculas que desencadeiam a doença (HILLER et al., 2002). Focke e colaboradores (2008) sugerem o uso de alérgenos recombinantes definidos para que os

problemas com relação ao uso de extratos naturais possam ser amenizados. Apesar dos esforços em desenvolver extratos padronizados com atividade biológica e reatividade de IgE conhecidos ou da determinação da concentração dos principais alérgenos, muitos extratos de grãos de pólen de gramíneas constituem-se ainda de misturas de componentes alergênicos e não alergênicos (VALENTA; NIEDERBERGER, 2007).

Atualmente, avanços na produção de alérgenos recombinantes tem permitido seu emprego no diagnóstico através de componentes definidos para avaliar o perfil individual de reatividade IgE do paciente, identificando assim, os alérgenos desencadeadores da doença. (VALENTA et al., 1999). O desenvolvimento de testes diagnósticos baseados em moléculas alergênicas imobilizadas em micro arranjos ou o uso de outras tecnologias *multiplex* permitem avaliar a resposta anticórpica a uma ampla variedade de epítomos e moléculas alergênicas utilizando pequenas quantidades de amostra de soro ou outros fluidos corporais (HILLER et al., 2002; HARWANEGG et al., 2003).

O termo diagnóstico por componentes definidos (*component-resolved diagnosis*) tem sido empregado para designar testes de diagnóstico baseados em moléculas alergênicas puras que são produzidas, tanto por expressão recombinante dos cDNAs codificadores do alérgeno ou por purificação de alérgenos a partir da fonte natural (VALENTA et al., 1999). Nestes testes estão incluídos alérgenos marcadores para diagnosticar uma sensibilização genuína dos pacientes frente a uma dada fonte alergênica ou a moléculas de reatividade cruzada que apontam para uma sensibilização cruzada a várias fontes alergênicas. Tais testes possibilitam a prescrição acurada de imunoterapia específica para pólen de bétula (KAZEMI-SHIRAZI et al. 2002; MOTHES; HORAK; VALENTA, 2004), pólen de gramíneas (KAZEMI-SHIRAZI et al. 2002), ácaros da poeira domiciliar (PITTNER et al., 2004), e gato (GRÖNLUND et al., 2003; REININGER et al., 2003), e também inclui marcadores para alergia a pólen de oliveira (PALOMARES et al., 2006) e *Parietaria judaica* (STUMVOLL et al., 2003).

Além de anticorpos IgE, anticorpos IgG, particularmente as subclasses IgG1 e IgG4 têm sido investigadas na alergia. Anticorpos IgG específicos a alérgenos podem ser detectados em indivíduos atópicos e não atópicos (SALLUSTO et al., 1993). No entanto, pacientes atópicos exibem altos níveis de IgG com predomínio de IgG4, enquanto indivíduos não-atópicos exibem maiores níveis de IgG1 (HAMMARSTRÖM; SMITH, 1987; PLATT'S-MILLS et al., 2001a).

1.5 Polinose

A polinose ou rinite alérgica sazonal (*hay fever*) é definida como a ocorrência de sintomas respiratórios (rinoconjuntivite e/ou asma) como resultado da inalação do grão de pólen ao qual o indivíduo está sensibilizado (BARTRA et al., 2009).

Uma característica importante da polinose é a periodicidade anual, sendo que os sintomas geralmente ocorrem na mesma época do ano, durante a polinização (SOLOMON, 1984; VIEIRA, 2003). As principais características clínicas são rinoconjuntivite e/ou asma brônquica, cujos sintomas são prurido ocular com hiperemia conjuntival, coriza, espirros, prurido nasal ou faringo-palatal, sendo que obstrução nasal pode estar presente ou mesmo ausente. 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, diferenciando-a do resfriado comum (VIEIRA, 1995). Sintomas de rinoconjuntivite alérgica não estão associados com um risco imediato de morte, porém a doença tem uma considerável influência na qualidade de vida do paciente e é um fator de risco independente em doenças como asma e sinusite (NATHAN, 2007).

Alérgenos de grãos de pólen são uma das principais causas de doenças alérgicas sazonais em todo o mundo, com uma incidência de sensibilização estimada de 20% da população em geral e de 40% entre os indivíduos atópicos (ANDERSSON; LIDHOLM, 2003). Esta prevalência pode variar dependendo de fatores ambientais, tais como presença de aeroalérgenos locais e grau de exposição, poluição do ar, temperatura e umidade, e predisposição genética dos indivíduos (BEASLY, 1998).

A sensibilização a alérgenos de grãos de pólen 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).

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 grãos de pólen de diferentes espécies de gramíneas é recomendada, uma vez que ocorre identidade alergênica ou reação cruzada entre as mesmas (WEBER, 2003). Testes de provocação nasal ou brônquica com antígenos polínicos e dosagem de IgE específica são métodos auxiliares de diagnóstico (VIEIRA, 1995; SOPELETE et al., 2006).

Atualmente, extratos brutos são freqüentemente usados no diagnóstico, através de testes cutâneos e também na imunoterapia (ARILA et al., 2001; ROSÁRIO-FILHO, 1987; FAHLBUSCH et al., 1998), embora suas potências alergênicas possam variar devido, no caso de grãos de pólen, às condições ambientais de cultivo das 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). O conteúdo alergênico de extratos brutos pode diferir não somente entre diferentes espécies de gramíneas e isoformas de alérgenos, mas também quanto ao grau de maturação dos grãos de pólen, os procedimentos de extração alergênica empregados e a estabilidade do extrato (NIEDERBERGER et al., 1998; VRTALA et al., 1993).

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, e no meio domiciliar há relato da manutenção dos alérgenos no interior das residências após a estação polínica (FAHLBUSCH et al., 2000). Nos dias em que a quantidade e a propagação de grãos de pólen 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 dos grãos de pólen 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).

1.6 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). 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).

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). Uma 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, RS e de 22,1% em Santo Ângelo, RS (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. Os grãos de pólen de gramíneas mais importantes clinicamente pertencem à subfamília Pooideae, cujos membros apresentam alta reatividade cruzada entre seus alérgenos (JUTEL et al., 2005). Dependendo da diversidade geográfica e das condições climáticas encontradas em certas áreas, diferentes espécies de gramíneas podem ocorrer (KNOX et al., 1993). Espécies como *Poa pratensis* (grama azul) e *Phleum pratense* (grama timóteo), dentre outras, também podem ser consideradas clinicamente relevantes dependendo da região geográfica (BASS et al., 2000; DAVIES et al., 2005).

Várias espécies de gramíneas produtoras de pólen têm sido reconhecidas como alergênicas, entre elas, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata* e *Cynodon dactylon* (KNOX; SUPHIOGLU, 1996; SUPHIOGLU, 2000; WEBER, 2003). *Lolium perenne* e algumas gramíneas da subfamília Pooideae são importantes fontes de alérgenos em regiões de clima temperado (FREIDHOFF et al., 1986; SMART, TUDDENHAM; KNOX, 1979;

WÜTHRICH et al., 1995), enquanto que grãos de pólen de *C. dactylon* são importantes em regiões de clima tropical (SCHUMACHER, 1985).

O pólen de *Phleum pratense* é uma importante fonte alergênica em regiões de clima temperado, tais como a Europa do Norte e Central (PETERSEN et al., 2006). Uma triagem clínica realizada com alérgenos recombinantes de gramíneas indicou que quatro alérgenos principais de gramíneas provenientes do pólen de *Phleum pratense* (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 e Phl p 6) compreendem os mais relevantes epítomos necessários para o diagnóstico e tratamento de alergia a pólen de gramíneas (JUTEL et al., 2005].

No Quadro 1 estão demonstradas algumas espécies de gramíneas da família Poaceae e sua hierarquia filogenética.

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

Quadro 1. Gramíneas da família Poaceae e sua hierarquia filogenética. O Gênero foi omitido com objetivo de simplificação. Nome comum apresentado refere-se ao nome conhecido em algumas regiões do Brasil. Adaptado de Lovborg et al. (1999).

1.7 Grãos de pólen e alérgenos

O grão de pólen (gametófito masculino) é uma estrutura especializada que alberga o gameta masculino 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 grãos de pólen ocorrem em vários formatos e apresentam uma parede mais externa, ou exina, constituída por esporopolenina, 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). 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 grãos 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). 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 grãos 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. Esses dados evidenciaram a implicação de grânulos de amido de pólen de gramíneas na asma alérgica (MOTTA et al., 2004).

Grãos de pólen sob condições de umidade não liberam somente alérgenos. 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.

Aliado a isso, 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).

Diferente dos alérgenos dos ácaros da poeira domiciliar, o risco de sensibilização a alérgenos ambientais, como os de grãos de pólen, não pode ainda ser adequadamente estimado pela sua simples contagem no ambiente (MONN; KOREN, 1999).

1.8 Alérgenos de pólen de gramíneas

Alérgenos de grãos de pólen de gramíneas têm sido estudados extensivamente desde os anos 60, e proteínas alergênicas provenientes de várias espécies tem sido isoladas e descritas (ANDERSSON, K.; LIDHOLM. J., 2003).

A alergenicidade dos grãos de pólen de gramíneas pode ser atribuída a um número limitado de proteínas que são rapidamente liberadas do grão de pólen sob hidratação (VRTALA et al., 1993; BEHRENDT et al., 1999)

De uma maneira geral, onze grupos de alérgenos já foram descritos em uma ou mais espécies de gramíneas (SUPHIOGLU, 2000). Tais grupos representam uma variedade de proteínas glicosiladas e não glicosiladas de tamanho, estrutura e propriedades físico-químicas variadas (ANDERSSON, K.; LIDHOLM. J., 2003). Do ponto de vista clínico, alérgenos do grupo 1 (31-35 kDa) são os mais importantes, reconhecidos por aproximadamente 95% de todos os pacientes sensíveis a pólen de gramíneas, seguidos pelos do grupo 5 (27-38 kDa), reconhecidos por até 85% destes pacientes (WEBER, 2003). Em conjunto, 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; VAN LEEWEN; AALBERSE, 1998). Por um lado, alérgenos do grupo 1 são mais prevalentes, já alérgenos do grupo 5 induzem maiores níveis de anticorpos IgE (DUFFORT et al., 2008).

Outros grupos importantes de alérgenos são grupos 2, 3, 4 e 13 reconhecidos por mais de 50 % dos indivíduos alérgicos (ANSARI; SHENBAGAMURTHI; MARSH, 1989; FAHLBUSCH et al., 1998; SUCK et al., 2000). No Quadro 2 está a classificação dos alérgenos de pólen de gramíneas e suas respectivas espécies (família Poaceae) de importância clínica.

Pólen de *Lolium perenne* é uma das principais fontes de proteínas alergênicas devido a sua ampla distribuição e abundante produção de pólen durante a floração (SMART; TUDDENHAM; KNOX, 1979). Segundo Ford e Baldo (1986), por SDS-PAGE, o extrato

bruto de pólen de *L. perenne* é constituído de pelo menos 17 alérgenos, cujos pesos moleculares variam de 12 a 89 kDa.

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

Alérgeno	Fonte	Massa Molecular, kDa	Reatividade de anticorpos IgE
Grupo 1	<i>Cynodon dactylon</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Paspalum notatum</i> , <i>Phalaris aquatica</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	31-35 kDa	95%
Grupo 2	<i>Cynodon dactylon</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	10-12	40-60%
Grupo 3	<i>Dactylis glomerata</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Phleum pratense</i>	10-12	60%
Grupo 4	<i>Dactylis glomerata</i> , <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	50-67	70%
Grupo 5	<i>Dactylis glomerata</i> , <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Lolium multiflorum</i> , <i>Phalaris aquatica</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	27-38	65-85%
Grupo 6	<i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	12-13	60-70%
Grupo 7	<i>Dactylis glomerata</i> , <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	8,7-8,8	10%
Grupo 10	<i>Cynodon dactylon</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Poa pratensis</i>	12	-
Grupo 11	<i>Cynodon dactylon</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Phleum pratense</i>	16-18	32%
Grupo 12	<i>Dactylis glomerata</i> , <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	14	15-30%
Grupo 13	<i>Dactylis glomerata</i> , <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	50-60	50%

Quadro 2. Classificação dos alérgenos de pólen de gramíneas. Adaptado: União Internacional das Sociedades de Imunologia, I.U.I.S (www.allergen.org); Allergome (www.allergome.com); Mohapatra; Lockety; Shirley (2005); Anderson; Lindholm (2003).

Em relação à gramínea *Lolium multiflorum*, estudos que caracterizam amplamente seus principais alérgenos e isoformas ainda são escassos na literatura científica, sendo que tem sido relatado apenas um alérgeno, Lol m 5, com massa molecular de 27-38 kDa (MOHAPATRA; LOCKEY; SHIRLEY, 2005). Além disso, em um estudo usando anticorpo monoclonal específico a Phl p 5 (alérgeno de grupo 5 de *Phleum pratense*), alérgenos do grupo 5 foram detectados em alguns extratos de gramíneas, incluindo extrato de *L. multiflorum* (SCHÄPPI et al., 1999). Em nosso recente trabalho, ao se avaliar as frações alergênicas imunodominantes no extrato de pólen de *L. multiflorum*, reconhecidas por anticorpos IgE, frações de 28-30 kDa e 31-34 kDa foram reconhecidas por mais de 90% dos soros de pacientes com polinose residentes no sul do Brasil (SOPELETE et al., 2006).

Vale a pena ressaltar que na literatura existem diferenças entre a massa molecular, deduzida a partir da seqüência de aminoácidos, e o tamanho aparente estimado por SDS-PAGE. Existem várias possíveis explicações para esse comportamento eletroforético dos polipeptídeos no SDS-PAGE, entre eles, a ocorrência de glicosilação, pontos isoelétricos ácidos ou básicos e, alto conteúdo de prolina. Segundo Suck et al. (2000) a alteração de um simples aminoácido pode promover uma mudança de mais de 10% na mobilidade de proteínas no SDS-PAGE.

Além disso, a ocorrência de vários componentes antigênicos de peso molecular semelhante, dentro de uma mesma espécie, pode ser devido à existência de isoformas, como as que ocorrem em Lol p 1 e Lol p 5 (4 e 8 isoformas respectivamente) (SMITH et al., 1994). Isoformas de uma proteína são essencialmente as mesmas proteínas, freqüentemente com o mesmo peso molecular, mas com pontos isoelétricos diferentes (ONG et al., 1993; SINGH et al., 1991), decorrentes de modificações pós-traducionais, entre elas, principalmente, glicosilação, hidroxilação e presença de resíduos de cisteína (SUPHIOGLU, 2000).

Representantes da maioria dos grupos de alérgenos de gramíneas têm sido clonados e produzidos como proteínas recombinantes definidas que podem ser usadas como ferramentas para estudar aspectos moleculares e celulares da sensibilização alergênica e da própria doença (DEWITT et al., 2006; TAMBORINI et al., 1997; VRTALA et al., 1999). Recentes descobertas focam o uso de alérgenos recombinantes em testes de diagnóstico para alergia e o desenvolvimento de fragmentos modificados para a abordagem terapêutica (ANDERSSON; LIDHOLM, 2003; LINHART et al., 2005; VRTALA et al., 2007).

1.9 Reatividade cruzada entre alérgenos de pólen de gramíneas da família Poaceae

Certos alérgenos são altamente específicos a uma determinada fonte alergênica, permitindo o diagnóstico preciso de uma sensibilização genuína à fonte alergênica correspondente. No entanto, outros alérgenos apresentam uma ampla reatividade cruzada com alérgenos presentes em muitas fontes não relacionadas, o que explica a sensibilização dos pacientes a essas fontes como um resultado de reatividade cruzada (VALENTA et al., 2010). As gramíneas podem apresentar epítomos de alérgenos de pólen compartilhados, sendo inclusive demonstradas similaridades imunoquímicas e estruturais entre seus principais alérgenos (FAHLBUSCH et al., 1998; WEBER, 2003). Esse compartilhamento de epítomos entre espécies também é conhecido como reatividade cruzada. Resumidamente, a definição de reatividade cruzada entre alérgenos baseia-se no reconhecimento imunológico: dois alérgenos apresentam reatividade cruzada se houver um único anticorpo que reaja a ambos (AALBERSE; AKKERDAAS; VAN REE, 2001).

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

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

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

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

Em recente estudo observou-se que alérgenos de gramíneas da subfamília Pooideae, a qual pertencem, por exemplo, *Lolium multiflorum* e *Pbleum pratense*, apresentam alta reatividade cruzada, ao utilizar um grupo representativo de alérgenos do grupo 1 de gramíneas, realizando alinhamento da sequência de aminoácidos, modelagem estrutural e comparação da superfície 3D, para exemplificar a base molecular da reatividade cruzada por IgE. Este dado pode ser explicado pelo fato de que, baseado nos níveis de IgE o sistema imune não distingue entre as diferentes espécies desta subfamília. O estudo sugere que o uso de qualquer espécie de Pooideae, para diagnóstico e imunoterapia, pode induzir efeitos similares, independente da gramínea utilizada (JOHANSEN et al., 2009).

Considerando-se a existência de reatividade cruzada, extratos totais ou parcialmente purificados de pólen de uma espécie de gramínea vêm sendo utilizados no diagnóstico e na imunoterapia (AALBERSE; AKKERDAAS; VAN REE, 2001). Entretanto, apesar da existência de reatividade cruzada, deve-se analisar a sensibilização individual do paciente uma vez que alérgenos únicos de determinadas espécies também ocorrem (DAVIES et al., 2005; WEBER, 2003).

Testes diagnósticos baseados em extratos alergênicos naturais são compostos de misturas pouco definidas de materiais não-alergênicos, alérgenos principais e alérgenos de reatividade cruzada (BOUSQUET; LOCKEY; MALLING, 1998), tornando difícil definir precisamente o alérgeno desencadeador da doença, particularmente em pacientes sensibilizados a mais de uma

fonte alergênica. Nesses casos, seria importante para o clínico saber se o paciente está co-sensibilizado a várias fontes alergênicas e assim precisaria de imunoterapia específica para cada alérgeno, ou se o paciente está sensibilizado a várias fontes devido à sensibilização aos componentes de reatividade cruzada em cada uma das fontes alergênicas suspeitas (sensibilização cruzada) (PAULI, G., 2000).

1.10 Grãos de pólen alergênicos no Brasil

Uma planta para ser considerada causadora de polinose deve ser anemófila, ou seja, deve apresentar dispersão de grãos 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 grãos 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, *Acacia* sp, *Araucaria* sp e *Eucalyptus* sp distribuem ao seu redor grande quantidade de pólen fortemente alergizante (VIEIRA, 2003). Outras espécies de gramíneas alergênicas crescem desordenadamente nas periferias das cidades e em terrenos abandonados como *Anthoxanthum odoratum* (grama doce), *Cynodon dactylon* (graminha), *Holcus lanatus* (capim lanudo), *Paspalum notatum* (grama forquilha) e *Bromus* sp (cevadilha), entre outras (KURTZ, 1998; VIEIRA, 2003).

1.11 *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

Sub-família: Pooideae

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 forrageira 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 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 (DUTRA; ROSÁRIO-FILHO; ZAVADNIAK, 2001; VIEIRA, 2002). Desta forma, mesmo cidades densamente povoadas podem apresentar grãos de pólen de azevém, transportados pelo vento na época de polinização (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.

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 adicional para o produtor nesses períodos (VIEIRA, 2003).

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).

Poucos estudos foram desenvolvidos para identificar as principais frações alergênicas presentes em extratos de pólen de *L. multiflorum* reconhecidas por IgE de pacientes com polinose (SOPELETE et al., 2006) e a sua relação com alérgenos de pólen de outras gramíneas a ela relacionadas (BERNARDES et al., 2010). Assim, estudos que caracterizem a resposta IgE, IgG1 e IgG4 aos principais alérgenos de *L. multiflorum* e sua relação com alérgenos de grãos de pólen de outras gramíneas são importantes para a melhor elucidação da resposta imune aos alérgenos dessa gramínea.

2 Objetivos

- 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 anticorpos IgG1 e IgG4 específicos aos alérgenos de *L. multiflorum* em pacientes com polinose, por ELISA;
- Identificar, por *immunoblotting*, as frações antigênicas do extrato total de *Lolium multiflorum* (Lm) reconhecidas por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 presentes no soro de pacientes com polinose;
- Avaliar a reatividade cruzada entre alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum* e *Pbleum pratense* por ensaios de ELISA e *immunoblotting* de inibição;
- Avaliar o perfil de reatividade IgE por meio de *microarray* de alérgenos em pacientes com polinose.

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), subordinado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) - Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos, segundo normas da Resolução CNS 196/96, sendo aprovado, sem restrições, em 07 de novembro de 2008 sob processo número 063/08 (Anexo 1).

A concordância em participar da pesquisa foi confirmada pela assinatura de um Termo de Consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) pelo indivíduo da pesquisa, de acordo com as normas da Resolução CNS 196/96. Os participantes tiveram o direito de se retirar do estudo sem necessidade de explicação prévia ou prejuízo ao atendimento atual ou futuro.

3.2 Avaliação clínica e seleção dos pacientes e indivíduos não atópicos do estudo

Todos os pacientes e indivíduos controles foram avaliados através de exame clínico e selecionados durante a estação polínica pelo médico especialista em alergia pela Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia, Prof. Dr. Francisco de Assis Machado Vieira (Caxias do Sul – RS) – Médico Alergista e professor titular de Farmacologia, Departamento de Ciências Biomédicas, Faculdade de Medicina, Universidade de Caxias do Sul, RS.

Foram selecionados 93 indivíduos com idade entre 6 e 55 anos, de ambos os gêneros, sendo agrupados da seguinte forma:

a. Pacientes sintomáticos com polinose

Foram selecionados 78 pacientes apresentando polinose, caracterizada clinicamente por rinoconjuntivite alérgica sazonal e/ou asma brônquica, de acordo com exame físico e teste cutâneo imediato de puntura (TCP) positivo para o extrato de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{PBS}).

b. Indivíduos controle

Como grupo controle dos pacientes com polinose, foram selecionados 10 indivíduos saudáveis, não atópicos, assintomáticos quanto a qualquer doença alérgica e com teste cutâneo

negativo a todos os alérgenos testados, inclusive ao extrato de pólen de *L. multiflorum*. Além deste grupo, 5 pacientes alérgicos com TCP negativo ao extrato de *L. multiflorum*, porém positivo a extratos de ácaros da poeira domiciliar foram incluídos no estudo.

Para a inclusão do paciente no momento da execução do TCP, todos os indivíduos foram julgados quanto aos seguintes critérios:

- uso de medicamentos, por via oral ou tópica, anterior ao teste, conforme indicado abaixo:
 - anti-histamínicos de primeira geração entre 24 a 72 horas antes do teste (BERNSTEIN; STORMS, 1995);
 - corticosteróides sistêmicos por tempo prolongado ($> 20\text{mg}/\text{dia}$ por mais de 7 dias) (SLOTT; ZWEIMAN, 1974);
 - corticosteróides tópicos na 2^a a 3^a semanas anteriores ao teste (PIPKORN; HAMMERLUND; ENERBAECK, 1989);
- presença de lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo;
- ter sido submetido ao tratamento com imunoterapia específica com alérgenos (vacina de alergia);
- recusa em participar do estudo.

3.3 Análises estatísticas

Inicialmente, para análises de comparações de média aritmética, foi realizado teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov a partir do qual foi possível verificar que as variáveis não apresentaram 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, ao teste cutâneo de punção e ao ELISA, e também no diagnóstico clínico.

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

Comparações entre médias aritméticas dos 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* 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA) e Microsoft Excel 2003 (Microsoft Co., EUA).

3.4 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 compatíveis (CHAVES-BORGES; MINEO, 1997).

A seguir, estão apresentadas as metodologias empregadas nos dois diferentes estudos abordados nesta tese (I e II).

ESTUDO I***Avaliação da resposta IgE, IgG1 e IgG4 específica a alérgenos de pólen de
Lolium multiflorum***

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob supervisão do Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi.

Pacientes

Dos 78 pacientes selecionados, para este estudo foram analisados 33 pacientes apresentando polinose, caracterizada clinicamente por rinoconjuntivite alérgica sazonal e/ou asma brônquica, de acordo exame físico e teste cutâneo imediato de puntura (TCP) positivo para o extrato bruto de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{PBS}). Como grupo controle, foram selecionados 10 indivíduos não atópicos, assintomáticos quanto a qualquer doença alérgica e com teste cutâneo negativo aos alérgenos testados, inclusive ao extrato de pólen de *L. multiflorum*.

Obtenção de grãos de pólen de *Lolium multiflorum*

Grãos de pólen de *L. multiflorum* foram coletados em fazendas do município de Caxias do Sul, RS, com ocorrência predominante desta gramínea, durante a estação de florescimento do azevém (setembro – dezembro, 2003), pelo Prof. Dr. Francisco de Assis Machado Vieira. A gramínea foi mantida por sete dias em uma sala com insolação para secagem, previamente preparada, onde foi estendido 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, e 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, permanecendo armazenado em tubos de armazenamento hermeticamente fechados a 4°C até os procedimentos de extração antigênica.

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 . 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), PMSF 1mM (Sigma), Benzamidina 1mM (Sigma) e Aprotinina 10 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma), seguido de incubação a 4°C por 18 horas sob agitação orbital constante. O conteúdo foi centrifugado a 20.000 x g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante final obtido foi dialisado (SPECTRA/POR[®] molecular porous membrane tubing MWCO: 6-8.000; Spectrum Medical Industries Inc., Houston, TX, EUA) contra PBS a 4°C, por 20 horas, sob leve agitação. O extrato dialisado foi aliquoteado e armazenado a - 20 °C.

O conteúdo protéico do extrato foi estimado pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como curva padrão de proteína, a soroalbumina bovina (BSA), em diluição dupla seriada de 500 $\mu\text{g/mL}$ a 15,6 $\mu\text{g/mL}$. 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). Este extrato foi denominado Lm_{PBS} e foi empregado na preparação do extrato para o teste cutâneo de puntura, e nos ensaios de ELISA e *immunoblotting* para detecção de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos a alérgenos de pólen de *L. multiflorum*.

Teste cutâneo de puntura

Os pacientes e os indivíduos controles foram submetidos ao teste cutâneo pelo método de puntura (TCP) para a avaliação da hipersensibilidade imediata a alérgenos de pólen de *L. multiflorum*. Para a realização do teste, foi utilizado extrato bruto de pólen de *L. multiflorum* (Lm_{PBS}) diluído em PBS fenol 0,4 % e glicerina a 50% em uma concentração final de 1 mg de proteína/mL (SOPELETE et al 2006). Além do extrato de pólen de *Lolium multiflorum*,

também foram utilizados extratos alergênicos comerciais de ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis* (IPI/ASAC, Brasil).

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 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) e controle negativo (solução salina fisiológica em fenol 0,4% e glicerina 50% – IPI/ASAC).

Após 15 minutos, foi feita 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, obtida pela média de dois diâmetros perpendiculares.

Coleta de sangue

Amostras de sangue (5 mL de crianças e 15 mL de adultos) 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 x g por 10 minutos, e os soros obtidos foram aliquotados, e armazenados a -20°C para realização de testes sorológicos.

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 (n = 33) e indivíduos não atópicos (n = 10), segundo técnica de ELISA descrita por Sopelete et al. (2006), com modificações.

Microplacas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®, Corning Laboratories Inc., NY, EUA), com 96 poços, foram sensibilizadas com extrato Lm_{PBS}, à

concentração de 20 µg/mL em um volume de 50 µL/poço, diluídos em tampão carbonato a 0,06M, pH 9,6 por 16 horas a 4°C em câmara úmida.

As placas foram lavadas três vezes em solução de PBS acrescido de Tween 20 (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil;) a 0,05% – (PBS-T) e bloqueadas com 100 µL de 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.

Após três lavagens prévias com PBS-T, amostras de soro diluídas a 1:2 foram adicionadas, em duplicata, em volumes de 50 µL/poço, e incubadas a 37°C por duas horas em câmara úmida. Foram utilizados soros controles positivos e controles negativos em cada placa. Após esta etapa, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T, e incubadas com anticorpo de cabra anti-IgE humana marcada com biotina (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, EUA) em uma diluição de 1:1.000, em volume de 50 µL/poço, seguindo de incubação por uma hora a 37°C. Subseqüentemente, após novo ciclo de seis lavagens, o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) foi adicionado às placas na diluição de 1:1.000, em volumes de 50 µL/poço, e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos.

Terminado o último ciclo de seis 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) em tampão citrato-fosfato 0,07 M, pH 4,2, contendo 0,03% de água oxigenada (H₂O₂ - Sigma).

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

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

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

Onde,

IE = índice ELISA; DO = densidade óptica média obtida de cada amostra de soro

Cut off = média da DO de 3 amostras de soros negativos + 5 DP

Amostras de soro com IE > 1,2 foram consideradas positivas 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 (IE = 1,0).

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

Para a detecção de anticorpos IgG1 e IgG4 anti-*L. multiflorum* foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizando amostras de soros de pacientes atópicos (n = 33) e indivíduos controles (n = 10), segundo técnica de ELISA (ALMEIDA et al., 2006) com modificações.

Microplacas de poliestireno de alta afinidade, com 96 poços (Corning) foram sensibilizadas com o extrato Lm_{PBS} à concentração de 20 µg/mL em um volume de 50 µL/poço, diluído em tampão carbonato a 0,06 M, pH 9,6 por 16 horas a 4°C em câmara úmida.

O diluente das amostras e a solução de lavagem foram os mesmos utilizados no ELISA-IgE, exceto para ELISA-IgG1 no qual o diluente utilizado foi PBS-T BSA a 0,1%, definido após a padronização da reação. As placas foram lavadas em PBS-T e bloqueadas com 100 µL/poço de PBS-T-BSA por uma hora à temperatura ambiente. Amostras de soro diluídas 1:5 foram testadas em duplicata, em volumes de 50 µL/poço, e incubadas a 37°C por 1 hora em câmara úmida. Posteriormente, foram adicionados os respectivos anticorpos secundários de camundongo consistindo de anti-IgG1 humana biotinizada (1:2.000) (Sigma) e anti-IgG4 humana biotinizada (1:2.000) (Sigma), seguido de incubação por uma hora a 37°C. Subseqüentemente, o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) foi adicionado às placas na diluição de 1:1.000 (IgG1) e 1:500 (IgG4), em volumes de 50 µL/poço, 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) em tampão citrato-fosfato, contendo 0,03% de H₂O₂ (Sigma).

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 – *cut off* – foi determinado pela média dos valores de DO dos soros controles negativos, acrescidos de três desvios padrões. O índice ELISA (IE) foi calculado como descrito para ELISA-IgE.

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para evidenciar os principais componentes antigênicos do extrato Lm_{PBS}, foi empregada a técnica de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em gradiente de concentração de 8-18%, sob condições desnaturantes e não redutoras, como descrito por Laemmli (1970), utilizando um sistema de eletroforese para mini-gel (Mini-vertical gel electrophoresis unit SE 260, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra).

As amostras foram diluídas em Tampão de Amostra (Tris-HCl 0,1M pH 6,8; SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2% e glicerol a 20%) (Sigma) e aquecidas a 100°C durante 3 minutos. As amostras foram aplicadas nos poços do gel, paralelamente aos padrões de peso molecular (BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As proteínas foram eletroforéticamente separadas utilizando uma corrente constante de 20 mA, por 1 hora e 30 minutos.

Após corrida, os géis foram corados por *Coomassie Blue* (Coomassie brilliant blue-R250, Sigma) e descorados em solução de 10% de ácido acético e 50% de metanol. Uma vez descorados foram mantidos em ácido acético 7% até a digitalização das imagens.

O *software* ImageQuant 300 versão 1.0.3 (General Electric Company – GE Healthcare, Uppsala, Suécia) foi utilizado para determinar as massas moleculares das frações visualizadas no gel, baseado nos valores de mobilidade relativa (Rf).

***Immunoblotting* para detecção de frações antigênicas de pólen de *L. multiflorum* ligantes de IgE, IgG1 e IgG4**

Após a separação eletroforética, por SDS-PAGE, os componentes protéicos do extrato Lm_{PBS} foram transferidos para membranas de nitrocelulose (Trans-Blot Transfer Medium, 0,45 µm, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA) embebidas em tampão de transferência (Glicina 0,04 M, Tris 0,05 M, SDS a 0,04% e álcool metílico a 20%), em sistema de transferência semi-úmido (Multiphor II Electrophoresis Unit, Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia) (TOWBIN; STSEHELIN; GORDON, 1979).

Para o *immunoblotting*, membranas de nitrocelulose, cortadas em tiras de 0,3 cm de largura, foram acondicionadas em placas adequadas para *immunoblotting* e bloqueadas com 800 µL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) acrescida de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil) a 5% por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação pendular lenta. Amostras de soros de pacientes com polinose (n = 33) e indivíduos controles (n = 10) foram diluídas a 1:5 em PBS-T acrescido de leite em pó desnatado a 1% (PBS-T-M) e incubadas sobre as tiras, em volume de 500µL/tira, por 18 horas à temperatura ambiente sob agitação lenta. Os procedimentos de lavagens das tiras de nitrocelulose, realizados após cada etapa da reação, constituíram-se de 6 ciclos de 5 minutos com aproximadamente 800 µL de solução de PBS-T.

Posteriormente, as membranas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação lenta, com anticorpos secundários biotinizados diluídos a 1:2.000 em PBS-T-M, em volume de 500 µL/tira: anti-IgE humana produzida em cabra (Kirkegaard), anti-IgG1 humana produzida em camundongo (Sigma) e anti-IgG4 humana produzida em camundongo (Sigma).

Após novas lavagens, as membranas foram incubadas com o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) diluído a 1:1.000 em PBS-T-M e incubado por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Após o ciclo final de lavagem, a revelação da reação foi procedida com a adição de 10 mg de tetra-hidrocloreto 3'3-diaminobenzidina (DAB, Sigma) diluído em 10 mL de solução salina tamponada com Tris (0,02 mM, pH 7,4) acrescido de 10 µL de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida pela adição de água destilada após a visualização das bandas. As membranas foram digitalizadas e as massas moleculares foram estimadas conforme descrito para SDS-PAGE.

ESTUDO II

Uso de micro arranjos de alérgenos para o diagnóstico por componentes definidos em pacientes alérgicos a pólen de gramíneas e ensaios de inibição para avaliação da reatividade cruzada entre extratos de pólen de *Lolium multiflorum* e *Phleum pratense*

Este estudo foi realizado no Instituto de Patofisiologia, Departamento de Imunopatologia da Universidade de Medicina de Viena, Áustria, sob a supervisão do prof. Dr. Rudolf Valenta.

Pacientes

Foram selecionados 78 pacientes (incluindo os 33 pacientes do estudo I) apresentando polinose, caracterizada clinicamente por rinoconjuntivite alérgica sazonal e/ou asma brônquica, de acordo com exame físico e teste cutâneo imediato de puntura (TCP) positivo para o extrato de *Lolium multiflorum* (Lm_{PBS}). Estes pacientes foram selecionados na Clínica de Alergia do Professor Dr. Francisco de Assis Machado Vieira na cidade de Caxias do Sul – RS.

Preparação dos extratos alergênicos

Grãos de pólen de *Lolium multiflorum* e *Phleum pratense* foram adquiridos comercialmente das empresas Greer Laboratories (Lenoir NC, EUA) e Allergon (Välinge, Suécia), respectivamente. Para o preparo dos extratos alergênicos, 1g de pólen foi homogeneizado em 50 mL de água destilada, contendo PMSF a 2 mM usando um homogeneizador (*Ultra Turrax*, Ika, Heidelberg, Alemanha) e a extração foi realizada sob agitação constante por 18 horas a 4°C. O conteúdo foi centrifugado a 16.000 x *g* por 15 minutos a 4°C para remoção de partículas insolúveis. O sobrenadante foi dividido em alíquotas de 1 mL, congelado, liofilizado e armazenado a -20°C até o uso. Os extratos liofilizados foram ressuspensos em 220 µL de água e o perfil protéico foi visualizado por SDS-PAGE 15% através da coloração por *coomassie brilliant blue* (Bio-Rad). O conteúdo protéico foi avaliado quantitativamente usando o kit *BCA Protein Assay* (Novagen, EUA). O extrato de pólen de *Lolium multiflorum* foi denominado Lm_{H₂O} e empregado, juntamente com o extrato de pólen de *Phleum pratense*, nos ensaios *immunoblotting* para detecção de grupos de alérgenos, e ELISA e *immunoblotting* de inibição.

Westernblotting para detecção dos grupos de alérgenos nos extratos naturais de pólen

Os extratos de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{H_2O}) e *Phleum pratense* foram separados por SDS-PAGE 15% e transferidos para membranas de nitrocelulose (TOWBIN; STSEHELIN; GORDON, 1979). As membranas foram cortadas em tiras de 5 mm e os extratos alergênicos transferidos foram marcados com antisoro de coelho produzido contra alérgenos dos grupos 1, 4, 5, 6, 7, 12 ou 13, segundo Niederberger et al. (1998), com modificações, diluídos a 1:5.000 em tampão A [50 mM de fosfato de sódio pH 7,5, 0,5% peso/volume de soroalbumina bovina (BSA), 0,5% v/v de Tween 20, 0,05% de NaN_3], em volume de 1.000 μ L, por 18 horas, a 4 °C. Os anticorpos de coelho ligados foram detectados usando um anticorpo de cabra anti-IgG de coelho marcado com ^{125} I (Perkin Elmer, EUA) diluído a 1:3.000 em tampão A, em volume de 1.000 μ L, por 1 hora, a temperatura ambiente. Alérgenos do grupo 2 foram detectados usando um anticorpo monoclonal humano anti-Phl p 2 a uma concentração de 0,1 μ g/mL (mAb2), em volume de 1.000 μ L, por 18 horas, a 4 °C (MARTH et al., 2004). As tiras foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-IgG1 humana produzido em camundongo (Pharmingen, San Diego, EUA), diluído a 1:1.000, em volume de 1.000 μ L, por 18 horas, a 4 °C. A detecção foi realizada com uma IgG de cabra anti IgG de camundongo marcado com ^{125} I diluído a 1:500, em volume de 1.000 μ L/tira, por 1 hora, a temperatura ambiente. A reação foi visualizada por autoradiografia usando filmes KODAK X-OMAT e telas de intensificação (Kodak, Heidelberg, Alemanha).

Experimentos de ELISA de inibição

Placas de ELISA (Nunc Maxisorb, Roskilde, Dinamarca) foram sensibilizadas com extrato de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{H_2O}) a 50 μ g/mL em tampão carbonato, em volume de 100 μ L, e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,05% de Tween (PBS-T), bloqueadas com 200 μ L de PBS-T contendo 2% de BSA (PBS-T-BSA) por 4 horas a temperatura ambiente e lavadas três vezes com PBS-T, segundo Niederberger et al. (1998), com modificações.

Para os ensaios de ELISA de inibição, soros de 78 pacientes alérgicos a pólen de gramíneas foram diluídos a 1:10, pré-incubados por 18 horas a 4°C em PBS-T-BSA (controle) ou em PBS-T-BSA contendo 100 µg/mL do extrato de pólen de *Lolium multiflorum*, ou 150 µg/mL do extrato de pólen *Phleum pratense*, ou 20 µg/mL de Phl p 6251 (Biomay, Vienna, Áustria). Em um ensaio preliminar, três concentrações diferentes do extrato de pólen de *Phleum pratense* (100, 150 e 200 µg/mL) foram testadas para avaliar a concentração ótima para inibir a ligação de IgE. Phl p 6251 representa uma molécula híbrida contendo os epítomos dos quatro principais alérgenos de *Phleum pratense* (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 e Phl p 6) (LINHART et al., 2005). Bet v 1, o principal alérgeno de bétula (*Betula verrucosa*, família Betulaceae), foi utilizado a 10 µg/mL para pré-incubação como controle (alérgeno irrelevante proveniente de pólen de árvore). As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C com 100 µL/poço dos soros pré-incubados. Após cinco passos de lavagem, foi adicionado o conjugado anti-IgE de cabra marcada com peroxidase (Kirkegaard) diluído a 1:2.500, em volume de 100 µL/poço, seguido de incubação por 1 hora a 37°C, e posteriormente por 1 hora a 4°C. Após o último ciclo de lavagens, a reação foi visualizada por meio da adição de 100 µL/poço do substrato enzimático consistindo de solução de 2,2'-diazino-bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid (ABTS) acrescido de água oxigenada (semelhante à técnica descrita no item ELISA IgE do estudo I).

Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de placas de ELISA. Todas as determinações foram realizadas em duplicatas. A porcentagem de inibição da ligação de IgE foi calculada pela seguinte fórmula: $[1 - (DO_{\text{com inibidor}} / DO_{\text{sem inibidor}})] \times 100$. A fórmula para o cálculo da reatividade cruzada é: inibição heteróloga / inibição homóloga.

Ensaio de *immunoblotting* de inibição

Os extratos de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{H2O}) e *Phleum pratense* foram separados por SDS-PAGE a 15% e transferidos para membranas de nitrocelulose (TOWBIN; STSEHELIN; GORDON, 1979).

Para este ensaio foram testadas amostras de soro de 6 pacientes alérgicos a pólen de gramíneas que foram testados no ELISA de inibição e apresentaram os mais baixos resultados de inibição a *Phleum pratense* no ensaio. Amostras de dois soros que tiveram resultados mais elevados de inibição pelo ELISA foram incluídas como controle.

Os soros foram diluídos a 1:15 em tampão A e foram pré-incubados por 4 horas a temperatura ambiente com um mix de alérgenos recombinantes rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p5 e rPhl p 6 purificados (Mix A) (Biomay); ou com um mix de alérgenos Phl p 4 e Phl p 12 purificados (Mix B) (alérgenos produzidos pela equipe do prof. Dr. Rudolf Valenta) (20µg/mL de cada alérgeno); ou com 150µg/mL de extrato de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{H2O}) ou *Phleum pratense*, ou somente tampão A, como controle. Soros pré-adsorvidos foram incubados por 18 horas a 4°C. As tiras de nitrocelulose foram bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente, e após uma rápida lavagem, elas foram incubadas por 18 horas a 4°C com os soros pré-adsorvidos. Após quarto passos de lavagem, os anticorpos IgE ligados foram detectados com anti-IgE humana marcada com I¹²⁵ (Demeditec Diagnostics, Kiel, Alemanha) a 1:20 em tampão A, incubadas por uma hora a temperatura ambiente e visualizadas por autoradiografia com filmes KODAK X-OMAT e telas de intensificação (Kodak) a -70°C (NIEDERBERGER et al., 1998).

Microarray baseado em alérgenos recombinantes e naturais para avaliação do perfil de reatividade IgE

Um kit comercial de lâminas contendo alérgenos recombinantes e naturais em micro arranjo (*Immuno-Solid phase Allergen Chips*, ISAC® – Phadia, VBC Genomics, Viena, Áustria) (HILLER et al., 2002) foi utilizado para avaliar a presença de anticorpos IgE específicos para 103 alérgenos diferentes nas amostras de soro de 78 pacientes com polinose selecionados para o estudo. Como controle, soros de cinco pacientes alérgicos a ácaros foram incluídos no experimento. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Rapidamente, estes chips de alérgenos foram incubados com 20 µL de soro de cada paciente e os anticorpos IgE foram detectados com anticorpos anti-IgE humana com marcador fluorescente. O perfil de reatividade IgE para cada paciente foi obtido e quantificado através do escaneamento da intensidade dos sinais de fluorescência (CapitalBio LuxScan 10K-A Microarray Scanner, CapitalBio Corp., Pequim, China). Os níveis de IgE específica a cada alérgeno foram expressos em ISU (*ISAC Standardized Units* – Unidades padronizadas de ISAC®). Dentre os 103 alérgenos testados, estavam presentes alérgenos de: pólen de gramíneas, alimentos, pólen de árvores e sementes, ácaros, veneno de insetos, fungos e epitélio de animais.

4 Resultados

ESTUDO I***Avaliação da resposta IgE, IgG1 e IgG4 específica a alérgenos de pólen de
Lolium multiflorum***

Características dos pacientes do estudo

Os pacientes e indivíduos analisados foram divididos em dois grupos, de acordo com a positividade no TCP ao extrato de pólen de *L. multiflorum*: grupo Lm+ (n = 33): pacientes com histórico clínico de polinose e TCP positivo ao extrato de *L. multiflorum*; e grupo NA (n = 10): indivíduos não atópicos e TCP negativo a qualquer extrato alergênico testado. As características demográficas e dos pacientes e indivíduos não atópicos que foram analisados neste estudo, estão demonstradas na Tabela 1. No grupo Lm+, o sintoma clínico predominantemente observado foi rinite alérgica (100%), seguido por conjuntivite (76%) e asma (3%) ($p < 0,01$).

Com relação ao teste cutâneo de puntura, o grupo Lm+ apresentou 100% de positividade ao extrato de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{PBS}). A positividade ao extrato de pólen foi maior que aos extratos de ácaros ($p < 0,0001$). Devido ao critério de seleção, todos os pacientes do grupo NA foram negativos para todos os extratos alergênicos testados.

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos dos pacientes com polinose e teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a extrato de pólen de *Lolium multiflorum* (LmPBS) (Lm+) e de indivíduos não atópicos (NA).

Características	Grupos	
	Lm+	NA
Número de indivíduos	33	10
Média de idade (anos)*	30±8	29±9
Sexo (Masculino/Feminino)	11/22	4/6
Diagnóstico Clínico (n, %)		
Rinite alérgica	33 (100%) ^a	0
Conjuntivite	25 (76%) ^b	0
Asma	1 (3%) ^c	0
Positividade ao TCP (n, %)		
<i>Lolium multiflorum</i>	33 (100%) ^a	0
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	18 (55%) ^b	0
<i>Dermatophagoides farinae</i>	12 (36%) ^b	0
<i>Blomia tropicalis</i>	10 (30%) ^b	0

* Média ± desvio padrão. ^{a,b,c} Diferentes letras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$), pelo teste de Qui-quadrado ou exato de Fisher, quando apropriado.

Quantificação de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 séricos específicos a antígenos de pólen de *Lolium multiflorum*

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram empregados para a detecção dos níveis de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 séricos específicos a antígenos de pólen de *L. multiflorum*, nos soros de pacientes com polinose (grupo Lm+, n = 33) e nos soros de indivíduos não atópicos (grupo NA, n = 10).

Ao se comparar as diferentes classes de anticorpos entre os grupos, no grupo Lm+ os níveis de anticorpos IgE (IE = $6,4 \pm 1,5$) e IgG4 (IE = $3,6 \pm 2,5$) foram significativamente maiores que no grupo NA ($p < 0,0001$) (Figura 1). Por outro lado, não houve diferença significativa nos níveis de anticorpos IgG1 entre os grupos Lm+ (IE = $1,5 \pm 1,3$) e NA (IE = $1,0 \pm 1,3$).

Comparando-se os níveis de anticorpos no grupo Lm+, os níveis médios de anticorpos IgE (IE = $6,4 \pm 1,5$) foram significativamente maiores que os níveis de IgG1 (IE = $1,5 \pm 1,3$) ($p < 0,0001$) e IgG4 (IE = $3,6 \pm 2,5$) ($p < 0,01$). A taxa de positividade para IgE (100%) foi significativamente maior que para IgG1 (39%) ($p < 0,0001$) e IgG4 (79%) ($p = 0,011$).

Não houve diferença significativa entre os níveis de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 no grupo NA. Entretanto, a taxa de positividade para os anticorpos IgG1 foi maior que para IgE e IgG4 ($p < 0,05$), uma vez que 30% dos indivíduos não atópicos apresentaram resultado positivo para IgG1.

Correlações positivas moderadas foram encontradas entre os níveis de anticorpos IgE e IgG1 ($r_s = 0,5$; $p = 0,0025$) (Figura 2A), IgE e IgG4 ($r_s = 0,61$; $p = 0,0001$) (Figura 2B), e entre os níveis de anticorpos IgG1 e IgG4 ($r_s = 0,59$; $p = 0,0003$) (Figura 2C). Entre IgE e IgG1, foi encontrada uma associação duplo positiva de 39%, e uma frequência de 61% dos pacientes positivos apenas para IgE (Figura 2A). Entre IgE e IgG4, observou-se uma associação duplo positiva de 79% e, 21% dos pacientes apresentaram resultados positivos apenas para IgE (Figura 2B). Associando-se os níveis de IgG1 e IgG4, 36% dos pacientes apresentaram resultados duplo-positivos, 18% duplo-negativos, 43% dos pacientes apresentaram resultados positivos apenas para IgG4 e 3% apenas para IgG1 (Figura 2C).

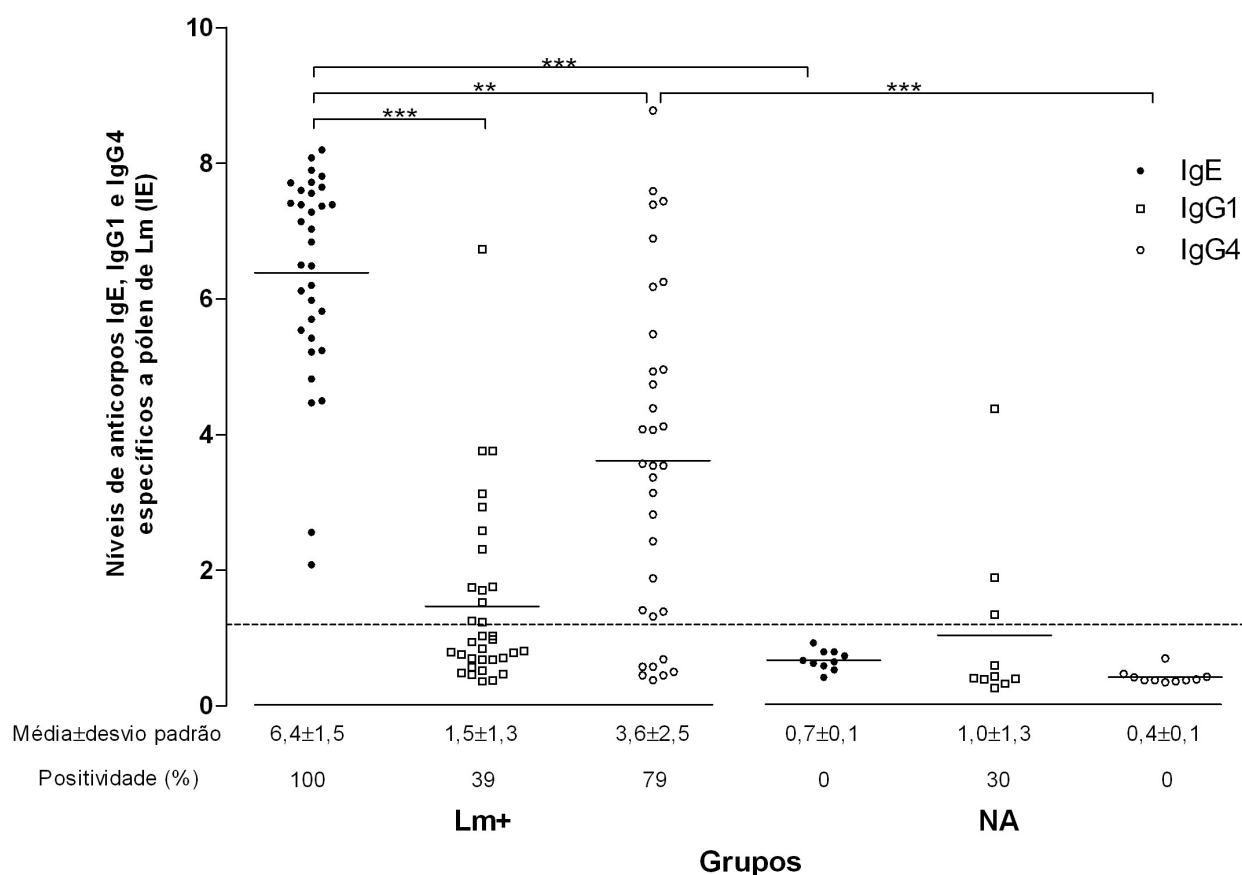


Figura 1. Níveis de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos a alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum*, obtidos através de ELISA e expressos em Índice ELISA (IE) em 33 amostras de soros de pacientes com TCP positivo a Lm (grupo Lm+) e 10 amostras de soros de indivíduos não atópicos (grupo NA). A barra horizontal em cada coluna representa a média do IE do grupo para cada classe de anticorpo e a linha tracejada o limiar de positividade do teste (IE = 1,2). Média aritmética ± desvio padrão e positividade (%) estão também apresentadas. ** p<0,01, *** p<0,001.

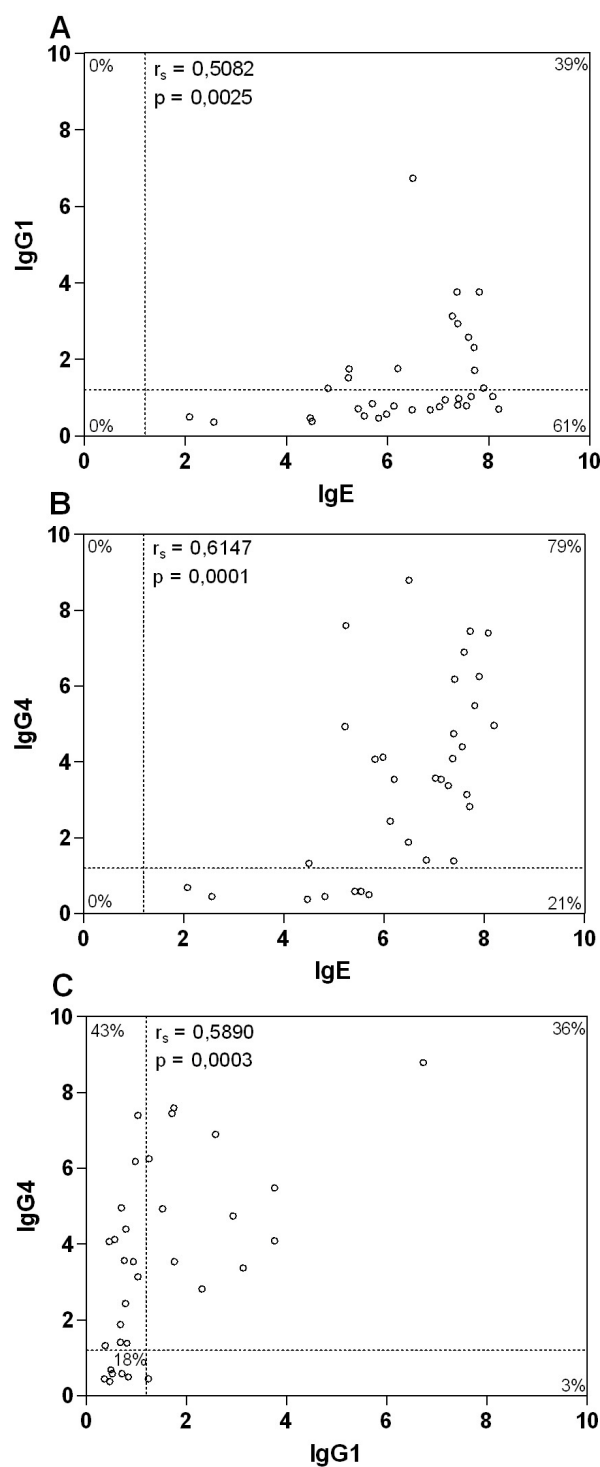


Figura 2. Correlação entre os níveis de anticorpos IgG1 e IgE (A), IgG4 e IgE (B) e entre os níveis de IgG1 e IgG4 (C) específicos a antígenos de pólen de *Lolium multiflorum* obtidos por ELISA e expressos em Índice ELISA (IE) no grupo Lm+ (n=33). Correlação de Spearman (r_s). As porcentagens de duplo positivo, duplo negativo ou simples positivo para cada extrato estão indicadas nos quadrantes correspondentes.

Análise eletroforética e reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 a componentes do extrato de pólen de *Lolium multiflorum*

O extrato de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{PBS}) apresentou concentração protéica total de 7.500 µg/mL e os componentes protéicos foram separados por SDS-PAGE 8-18% e corados com *coomassie brilliant blue*. Em toda a extensão do gel foram visualizadas várias frações protéicas com massas moleculares relativas no intervalo de 10 a 101 kDa (Figura 3A). As frações visualizadas foram as de 10, 12, 16, 17, 18, 20, 24, 26, 29, 32, 35, 37, 43, 47, 54, 57, 71, 82, 83 e 101 kDa.

O perfil dos componentes ligantes de IgE, IgG1 e IgG4 presentes no extrato Lm_{PBS} foi analisado por *immunoblotting* em 33 amostras de soro de pacientes com polinose e 10 amostras de soro de indivíduos não atópicos. O painel representativo da reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 no soro de 3 pacientes do grupo Lm+ está demonstrado na Figura 3B.

Na Figura 4, está representada a freqüência de reconhecimento dos componentes do extrato Lm_{PBS} por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4. Com relação ao grupo Lm+ (Figura 4A), os componentes protéicos do extrato Lm_{PBS} mais frequentemente reconhecidos (>50%) por anticorpos IgE e considerados imunodominantes foram: 10 kDa (85%), 20 kDa (73%), 24 kDa (82%), 26 kDa (100%), 29 kDa (100%), 32 kDa (100%), 35 kDa (73%), 37 kDa (64%), 47 kDa (64%), 54 kDa (88%) e 57 kDa (91%).

A reatividade de anticorpos IgG1 foi mais frequentemente visualizada nos componentes de 10 kDa (82%), 24 kDa (67%), 26 kDa (97%), 29 kDa (97%), 32 kDa (97%), 54 kDa (85%), 57 kDa (79%) e 71 kDa (67%).

Já a reatividade de anticorpos IgG4 foi mais freqüente (>50%) apenas nas frações de 26 kDa (70%), 29 kDa (94%), 32 kDa (73%), 54 kDa (85%) e 57 kDa (70%). As frações comumente reconhecidas (>50%) pelas três classes de anticorpos foram as de 26, 29, 32, 54 e 57 kDa.

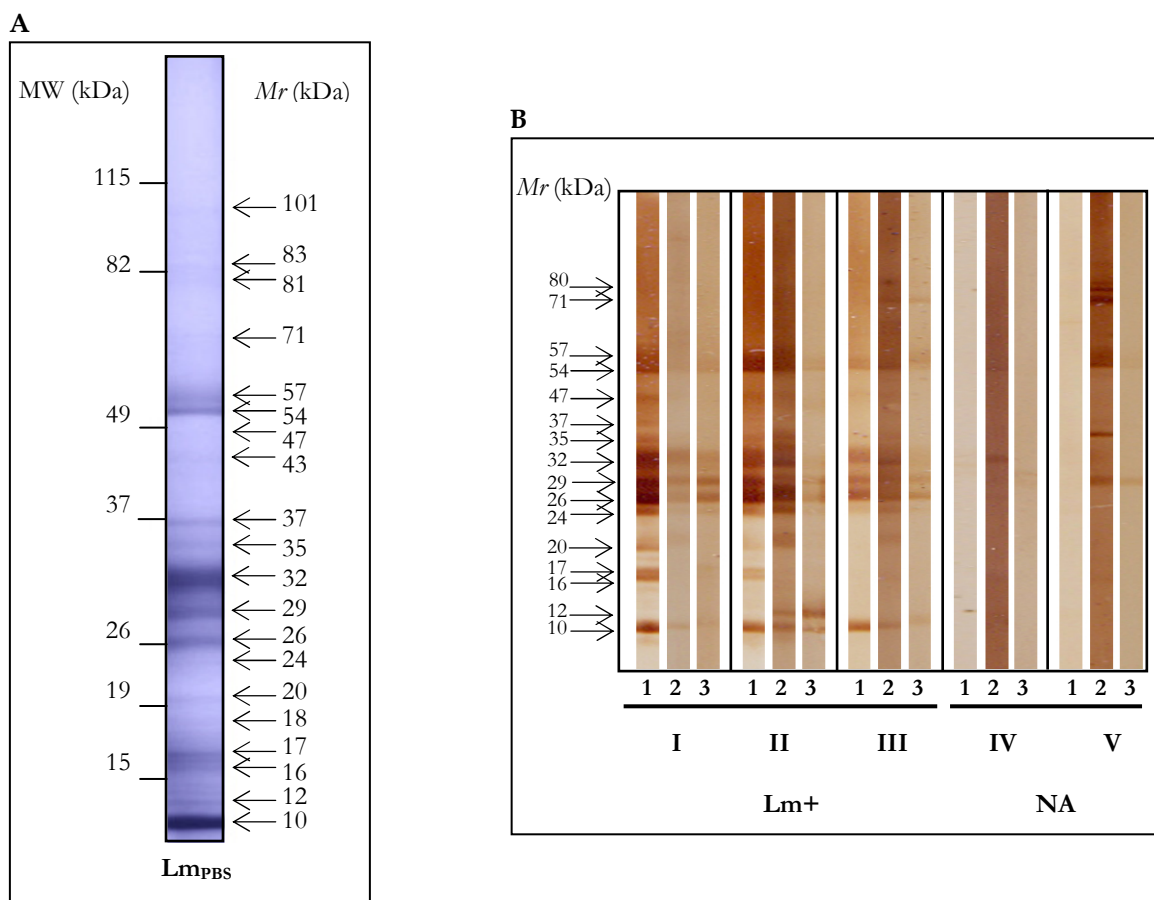


Figura 3. (A) Perfil eletroforético (SDS-PAGE gradiente 8-18%) do extrato de *Lolium multiflorum* (LmpBS). (B) *Immunoblotting* representativo para a reatividade a anticorpos IgE (1), IgG1(2) e IgG4(3) no soro de 3 pacientes do grupo Lm+ (I, II e III) e 2 pacientes do grupo NA (IV e V). MW: padrão de peso molecular. Mr : massa molecular relativa em kilodalton (kDa).

No grupo NA (Figura 4B), não houve reatividade de anticorpos IgE, e para anticorpos IgG4 houve reatividade inferior a 50% nas frações protéicas de 29 kDa (40%), 32 kDa (10%), 37 kDa (10%), 54 kDa (40%) e 57 kDa (20%). Anticorpos IgG1 apresentaram reatividade principalmente (>50%) aos componentes de 29 kDa (70%), 32 kDa (50%), 54 kDa (60%) e 71 kDa (70%). Estes componentes também foram reconhecidos por anticorpos IgG1 nos pacientes Lm+.

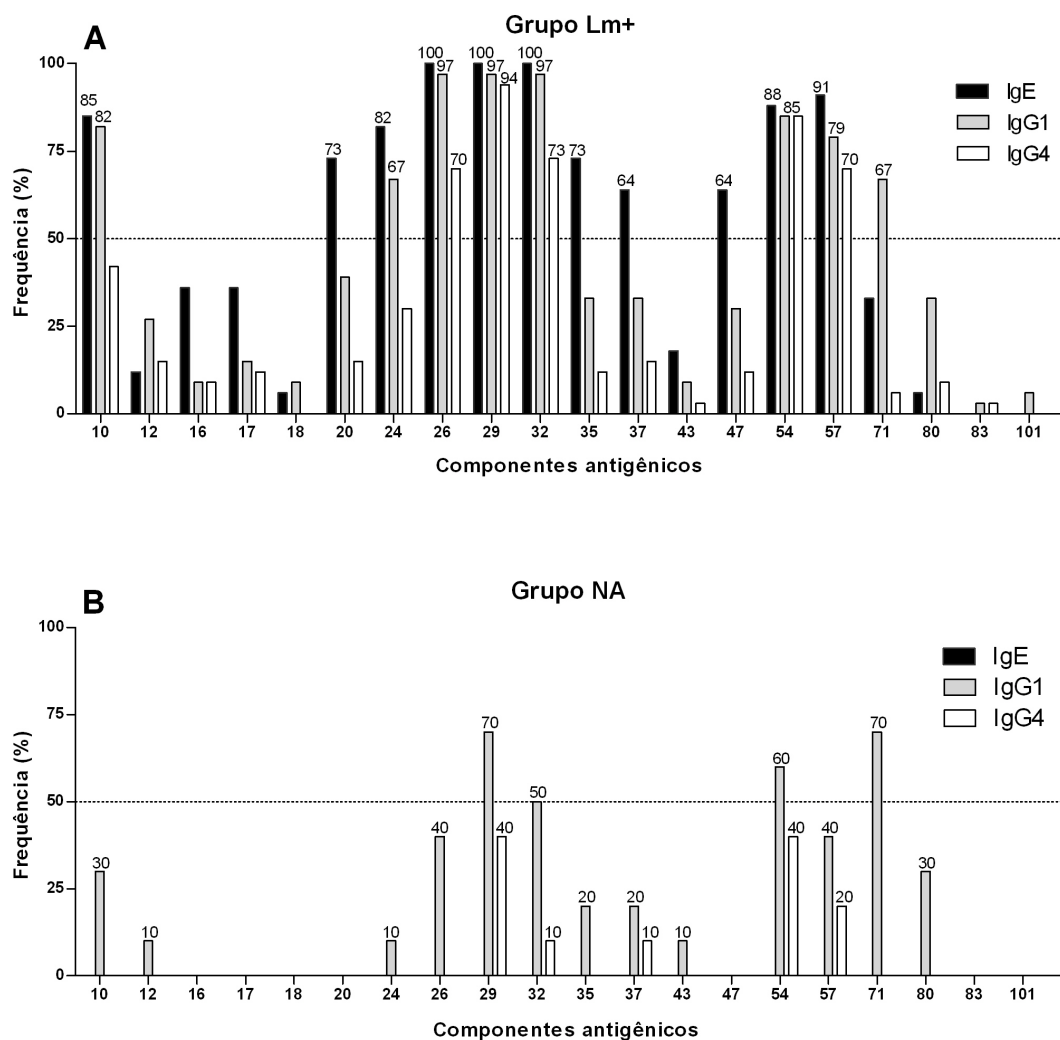


Figura 4. Frequência percentual de reconhecimento dos componentes antigênicos do extrato de pólen de *Lolium multiflorum* por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 no soro de pacientes com polinose (Lm+) (A) e indivíduos não atópicos (NA) (B). A linha pontilhada indica reconhecimento de 50%.

ESTUDO II***Uso de micro arranjos de alérgenos para o diagnóstico por componentes definidos em pacientes alérgicos a pólen de gramíneas e ensaios de inibição para avaliação da reatividade cruzada entre extratos de pólen de *Lolium multiflorum* e *Phleum pratense****

Características dos pacientes do estudo

As características demográficas e clínicas dos pacientes analisados neste estudo estão demonstradas na Tabela 2. Foram analisados 78 pacientes alérgicos a pólen de *L. multiflorum* (polinose) e 5 pacientes alérgicos apenas a ácaros (controle).

No grupo polinose, o sintoma clínico predominantemente observado foi rinite alérgica (97%), seguido por conjuntivite (83%) ($p < 0,01$). Casos de asma ocorreram em somente 5% dos pacientes. No grupo controle, sintomas de rinite alérgica foram mais freqüentes do que sintomas de asma ($p < 0,05$).

Comparando-se os dois grupos, o sintoma de conjuntivite foi mais frequente no grupo polinose ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os sintomas rinite alérgica e asma.

Com relação ao teste cutâneo de puntura, no grupo polinose houve 100% de positividade ao extrato de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{PBS}), que foi significativamente maior que a positividade aos extratos de ácaros ($p < 0,0001$). A positividade ao extrato de *D. pteronyssinus* (45%) foi maior que ao extrato de *D. farinae* (27%) ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre as positivities para o extrato de *D. pteronyssinus* (45%) e *B. tropicalis* (29%), e entre *D. farinae* (27%) e *B. tropicalis* (29%). O grupo controle apresentou positividade maior a extratos de ácaros ($p = 0,0002$). Comparando-se os dois grupos, houve maior positividade ao extrato de pólen de *Lolium multiflorum* no grupo polinose ($p < 0,0001$), e no grupo controle houve maior positividade aos extratos de ácaros *D. pteronyssinus* ($p = 0,0227$), *D. farinae* ($p = 0,0023$) e *B. tropicalis* ($p = 0,0034$).

Tabela 2. Características demográficas, sintomas clínicos e resultado de teste cutâneo de puntura (TCP) (positividade, %) dos 78 pacientes com polinose e 5 pacientes alérgicos a ácaros da poeira domiciliar (controle). 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 demográficas	Grupos	
	Polinose	Controle
Número de indivíduos	78	5
Média de idade (anos)*	31±10	20±7
Gênero (Masculino/Feminino)	28/50	2/3
Sintomas Clínicos (n, %)		
Rinite alérgica	76 (97%) ^a	5 (100%) ^a
Conjuntivite	65 (83%) ^b	2 (40%) ^a
Asma	4 (5%) ^c	1 (20%) ^b
Positividade ao TCP (n, %)		
<i>Lolium multiflorum</i>	78 (100%) ^a	0 ^b
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	35 (45%) ^b	5 (100%) ^a
<i>Dermatophagoides farinae</i>	21 (27%) ^c	5 (100%) ^a
<i>Blomia tropicalis</i>	23 (29%) ^{b, c}	5 (100%) ^a

Média ± desvio padrão. ^a, ^b, ^c Diferentes letras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Qui-quadrado ou exato de Fisher, quando apropriado.

Caracterização alergênica e reatividade cruzada entre os extratos de pólen de *Lolium multiflorum*, *Phleum pratense* e molécula híbrida (Phl p 6251)

Os extratos de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{H2O}) e *Phleum pratense* apresentaram concentração protéica total de 12.000 µg/mL e 11.325 µg/mL, respectivamente. Os componentes protéicos foram separados por SDS-PAGE 15% e corados com *coomassie brilliant blue*. O perfil eletroforético dos dois extratos está representado na Figura 5.

O conteúdo alergênico dos extratos de *Lolium multiflorum* (Lm_{H2O}) e *Phleum pratense* foi comparado por *westernblotting* usando um painel de anticorpos monoclonais e polinoclonais naturais produzidos contra alérgenos individuais de grãos de pólen de gramíneas que reconhecem os principais grupos alergênicos. Foram detectados alérgenos dos grupos 1, 2, 4, 5, 7, 12 e 13 em ambos os extratos. Alérgeno do grupo 6 foi detectado somente no extrato de *Phleum pratense*, não sendo detectado no extrato de *Lolium multiflorum* (Tabela 3).

Ensaio de ELISA de inibição utilizando o extrato de pólen de *Lolium multiflorum* na fase sólida foram realizados para determinar o nível de reatividade cruzada dos epítomos para anticorpos IgE entre alérgenos contidos em ambos os extratos (*Lolium multiflorum* e *Phleum pratense*), e também entre a molécula híbrida (Phl p 6251) utilizando o soro de 78 pacientes do grupo polinose.

Foi encontrado um alto nível de inibição homóloga (pré-adsorção do soro com *Lolium multiflorum*) para a reatividade IgE (média: 89±7%). A incubação do soro com extrato de *Phleum pratense*, resultou em uma inibição heteróloga de 59±15% da ligação de IgE aos alérgenos do extrato de *Lolium multiflorum* (Figura 6). Quando o soro foi pré-adsorvido com a molécula híbrida (Phl p 6251), contendo epítomos para IgE dos quatro principais alérgenos de *Phleum pratense*, a inibição média foi 51±18% (Figura 6).

O nível de inibição homóloga foi significativamente maior que o nível de inibição heteróloga usando o extrato de *Phleum pratense* ou a molécula híbrida ($p < 0,0001$). Foi calculado que existe um nível de reatividade cruzada de 66,3% entre *Phleum pratense* e *Lolium multiflorum* e que 57% dos epítomos de *Lolium multiflorum* estão representados na molécula híbrida.

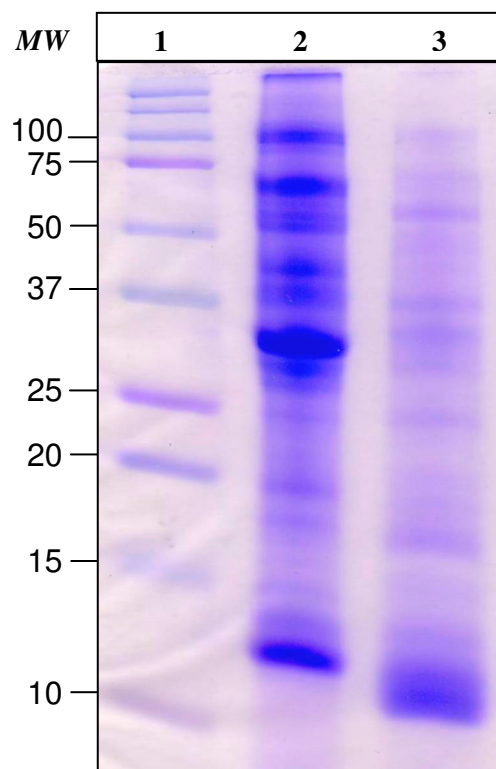


Figura 5. Perfil eletroforético dos extratos de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{H_2O}) (faixa 2) e *Pbleum pratense* (faixa 3) em SDS-PAGE a 15%, corados por *coomassie brilliant blue*. Na faixa 1 está o padrão de peso molecular. *MW*: padrão de peso molecular, em kilodalton (kDa).

Tabela 3. Presença de alérgenos dos grupos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 12 e 13 nos extratos de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{H2O}) e *Pbleum pratense* determinado por *westernblotting* utilizando anticorpos específicos produzidos contra cada grupo de alérgenos.

Alérgeno	MW, kDa	Extrato	
		<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Pbleum pratense</i>
Grupo 1	31-35	+	+
Grupo 2	10-12	+	+
Grupo 4	50-67	+	+
Grupo 5	27-33	+	+
Grupo 6	~13	-	+
Grupo 7	~8,7	+	+
Grupo 12	14	+	+
Grupo 13	58	+	+

MW: peso molecular em kilodalton (kDa). +, detecção no peso molecular esperado. -, ausência de detecção.

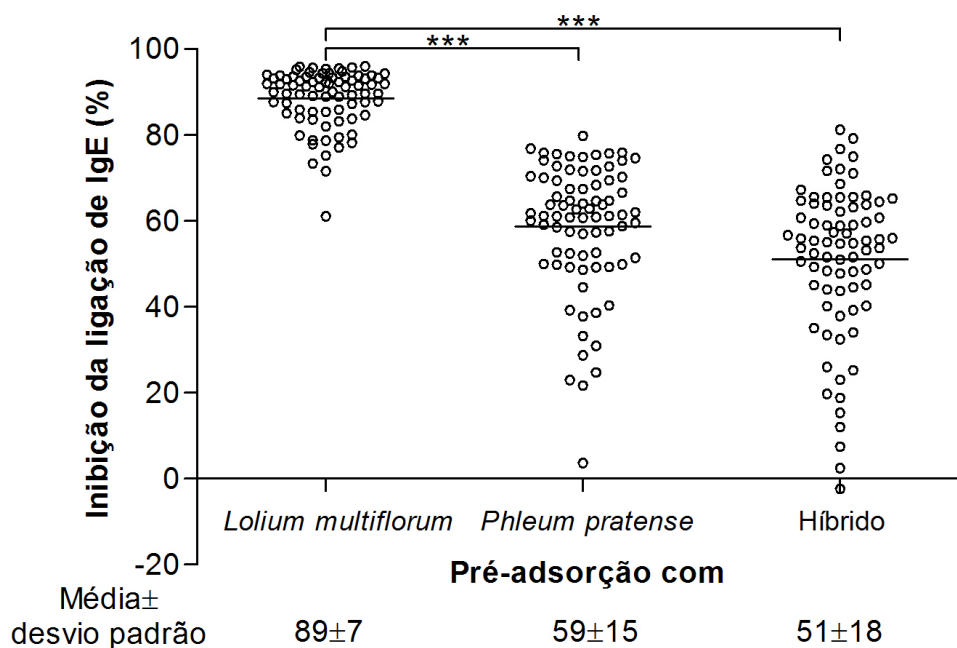


Figura 6. Inibição da ligação de IgE por ELISA, ao extrato de *Lolium multiflorum* (eixo y), expresso em porcentagem após a pré-adsorção dos soros do grupo polinose ($n = 78$) com extrato de pólen de *Lolium multiflorum*, extrato de pólen de *Phleum pratense* ou com a molécula híbrida carreadora dos quatro principais alérgenos de pólen da gramínea *Phleum pratense*: Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 e Phl p 6 (eixo x). A barra horizontal em cada coluna representa a média de inibição. Diferenças significativas dentre os valores foram determinados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn (***) ($p < 0,0001$). Média aritmética $\pm$ desvio padrão estão também apresentados.

Perfil de reatividade cruzada de IgE aos extratos de *Lolium multiflorum* e *Phleum pratense* por immunoblotting

Para este experimento, foram selecionadas seis amostras individuais de soros de pacientes alérgicos a pólen de *Lolium multiflorum* que tiveram os mais baixos níveis de inibição ao extrato de *Phleum pratense* pelo ELISA. Amostras de dois soros que tiveram resultados mais elevados de inibição pelo ELISA foram incluídas como controle.

Os resultados de *immunoblotting* revelaram um perfil de reatividade IgE diferente ao se usar extrato de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{H2O}) ou extrato de *Phleum pratense* (Figura 7). Um maior reconhecimento de alérgenos contidos na membrana de *Lolium multiflorum* foi observado (cerca de 12 kDa, 25-37 kDa, 50 kDa e 75 kDa) nas seis amostras testadas. Na membrana de *Phleum pratense*, os seis pacientes reconhecem as frações de 12 e 25-37 kDa.

A pré-incubação do soro com extrato de pólen de *Lolium multiflorum* inibiu quase completamente a reação IgE aos alérgenos de *Phleum pratense*. Por outro lado, a pré-incubação do soro com o extrato de *Phleum pratense* não inibiu completamente a ligação da IgE sérica aos alérgenos de *Lolium multiflorum*, especialmente no intervalo de 25-37 kDa e também nas frações em torno de 37 e também de 50 kDa. A ligação de IgE à fração em torno de 12 kDa foi inibida pelo extrato de *Phleum pratense* e também pelo mix A (Phl p 4 e Phl p 12). A pré-incubação com o mix B (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 e Phl p 6) reduziu a intensidade da reação, porém sem inibição considerável, exceto para alérgenos em torno de 12 kDa.

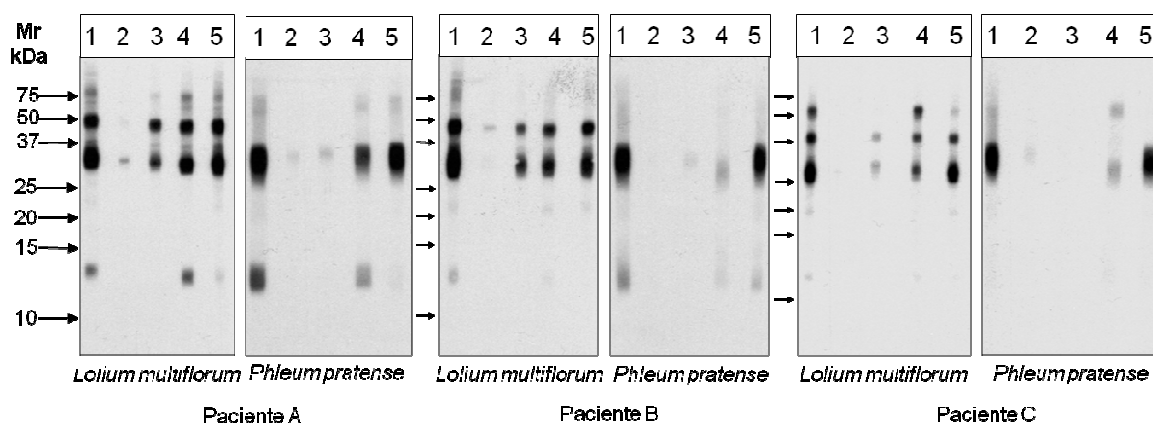


Figura 7. *Immunoblotting* de inibição da ligação de anticorpos IgE séricos aos extratos de *Lolium multiflorum* e *Phleum pratense*. Sem inibidor (1); após inibição com: extrato de pólen de *Lolium multiflorum* (2), extrato de pólen de *Phleum pratense* (3), mistura de alérgenos purificados Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 e Phl p 6 (4), ou mistura de alérgenos Phl p 4 e Phl p 12 purificados (5). Os três soros representativos pertencem ao grupo polinose. Os soros dos pacientes A e B representados na figura foram selecionados por terem apresentado um baixo nível de inibição da ligação de IgE ao extrato de pólen de *Lolium multiflorum* após pre-incubação com extrato de pólen de *Phleum pratense* no ensaio de ELISA. O paciente C apresentou níveis maiores de inibição no ELISA, e foi usado como controle no *immunoblotting* de inibição. Mr: massa molecular relativa, em kilodalton (kDa).

Perfil de reatividade IgE por *microarray* de alérgenos definidos

O diagnóstico de alergia a pólen de gramíneas foi realizado em 78 soros de pacientes com polinose e 5 soros de pacientes alérgicos apenas a ácaros, empregando-se um kit comercial (ISAC®) de micro arranjos de 103 alérgenos específicos purificados, naturais ou recombinantes.

Cinquenta alérgenos foram reconhecidos por pelo menos um paciente da população estudada. A frequência de reatividade dos pacientes aos alérgenos específicos está representada na Figura 8. Como esperado, pólen de gramíneas representou a principal fonte sensibilizante desta população.

Dos 78 pacientes que apresentaram TCP positivo ao extrato de *Lolium multiflorum*, 77 foram diagnosticados com alergia a pólen de gramíneas usando o ISAC®. Alérgenos de *Lolium* sp não estavam presentes no *microarray*, assim não houve positividade a *Lolium* sp. Dentre os alérgenos presentes no ISAC®, os mais frequentemente reconhecidos foram Phl p 1 (95%), Cyn d 1 (85%), Phl p 5 (82%), Phl p 2 (76%), Phl p 4 (64%) e Phl p 6 (45%). Na Tabela 4 estão representadas a fonte, a frequência de reconhecimento e a média de ISU (unidades padronizadas de ISAC®) para cada alérgeno reconhecido. Poucos pacientes apresentaram anticorpos IgE a profilina (Phl p 12; 18%) e nenhum estava sensibilizado a Phl p 7. Nenhum paciente apresentou reatividade IgE a Bet v 1, o principal alérgeno de bétula.

Alérgenos de ácaros da poeira domiciliar foram pouco reconhecidos: Der p 2 (13%), Der f 2 (13%), Der p 1 (12%), Der f 1 (5%) e Eur m 2 (4%). Comparando-se ao TCP (Tabela 2), onde extratos totais de ácaros foram utilizados, diferentes resultados foram obtidos: *Dermatophagoides pteronyssinus* – 45% e *Dermatophagoides farinae* – 27%. Os pacientes controles (TCP positivo para ácaros) não estavam sensibilizados a alérgenos de pólen de gramíneas, sendo que quatro estavam sensibilizados apenas a alérgenos de ácaros: Der p 1 (80%), Der p 2 (80%), Der f 1 (60%), Der f 2 (60%) e Eur m 2 (40%) (dados não mostrados) e um paciente controle não apresentou sensibilização a nenhum alérgeno testado no ISAC®. Porém, ao TCP, os cinco pacientes controles estavam sensibilizados aos extratos de *Dermatophagoides pteronyssinus* – 100%, e *Dermatophagoides farinae* – 100% (Tabela 2). Alérgenos de *Blomia tropicalis* não estavam presentes no *microarray*.

Com relação aos alérgenos de pólen de gramíneas, que foram os mais frequentemente reconhecidos, na Figura 9 estão apresentados os níveis de IgE específica para cada alérgeno, expressos em ISU (*ISAC Standardized Units* – Unidades padronizadas de ISAC®). O nível médio de IgE específica, expresso em ISU, foi maior para Phl p 5 (26 ± 29), quando comparado com Cyn d 1 (12 ± 20), Phl p 2 (11 ± 14), Phl p 4 (11 ± 19), Phl p 6 (7 ± 9), Phl p 11 (4 ± 4) e Phl p 12 (8 ± 16) ($p < 0,01$). Não houve diferença entre os níveis de IgE específica entre Phl p 1 e Phl p 5. Os níveis de IgE específica foram maiores para Phl p 1 do que para Phl p 11 ($p < 0,05$).

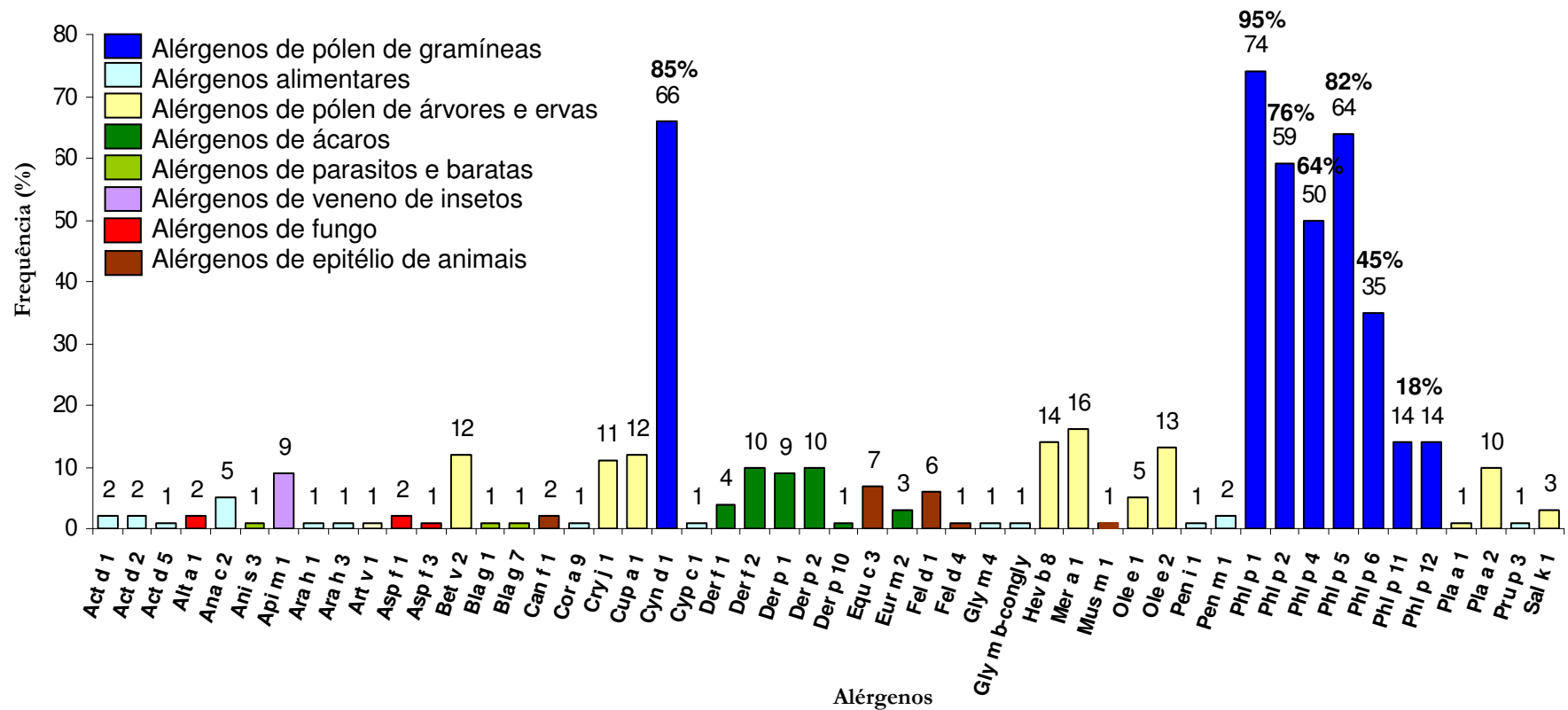


Figura 8. Frequência de reconhecimento alergênico por IgE sérica de 78 pacientes alérgicos a pólen de gramíneas. Coluna azul: alérgeno de pólen de gramíneas; coluna azul claro: alérgenos alimentares; coluna amarela: alérgenos de árvores e ervas; coluna verde: alérgenos de ácaros; coluna verde claro: alérgenos de parasitos e baratas; coluna violeta: alérgenos de veneno de inseto; coluna vermelha: alérgenos de fungo; coluna marrom: alérgenos de epitélio de animais.

Tabela 4. Características dos 50 alérgenos reconhecidos por 78 pacientes com polinose.

	Fonte	Nome científico	Alérgeno	Frequência de reconhecimento %	ISU* médio	
1	Alérgenos de pólen de gramíneas	Grama bermuda	<i>Cynodon dactylon</i>	Cyn d 1	85	12,2
2				Phl p 1	95	16,2
3				Phl p 2	76	11,0
4				Phl p 4	64	11,1
5		Grama timóteo	<i>Phleum pratense</i>	Phl p 5	82	25,9
6				Phl p 6	45	7,0
7				Phl p 11	18	3,9
8				Phl p 12	18	8,2
9	Alérgenos alimentares	Kiwi	<i>Actinidea deliciosa</i>	Act d 1	3	2,6
10				Act d 2	3	3,9
11				Act d 5	1	4,0
12		Castanha de caju	<i>Anacardium occidentale</i>	Ana o 2	6	1,4
13		Amendoim	<i>Arachis hypogaea</i>	Ara h 1	1	1,8
14				Ara h 3	1	7,5
15		Avelã	<i>Corylus avellana</i>	Cor a 9	1	0,8
16		Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	Cyp c 1	1	1,7
17		Soja	<i>Glycine max</i>	Gly m 4	1	0,7
18				Gly m Æÿ	1	0,5
19		Camarão	<i>Penaeus indicus</i>	Pen i 1	1	0,9
20			<i>Penaeus monodon</i>	Pen m 1	3	1,3
21		Pêssego	<i>Prunus persica</i>	Pru p 3	1	4,3
22	Alérgenos de pólen de árvores e de ervas	Artemisia	<i>Artemisia vulgaris</i>	Art v 1	1	0,7
23		Bétula	<i>Betula verrucosa</i>	Bet v 2	15	10,0
24		Cedro-japonês	<i>Cryptomeria japonica</i>	Cry j 1	14	2,4
25		Cupressus	<i>Cupressus arizonica</i>	Cup a 1	15	3,7
26		Látex	<i>Hevea brasiliensis</i>	Hev b 8	18	11,5
28		Mercurialis	<i>Mercurialis annua</i>	Mer a 1	21	11,8
27		Oliveira	<i>Olea europaea</i>	Ole e 1	6	2,3
29				Ole e 2	17	8,5
30		Plátano	<i>Platanus acerifolia</i>	Pla a 1	1	1,0
31				Pla a 2	13	3,3
32		-	<i>Salsola kali</i>	Sal k 1	4	1,4
33	Alérgenos de ácaros	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Der f 1	5	16,6
34				Der f 2	13	13,3
35				Der p 1	12	14,1
36				Der p 10	1	1,2
37				Der p 2	13	14,1
38		<i>Euroglyphus maynei</i>	Eur m 2	4	5,6	
39	Alérgenos de parasitos e barata	Nematódeo	<i>Anisakis simplex</i>	Ani s 3	1	1,7
40		Barata	<i>Blattella germanica</i>	Bla g 1	1	0,7
41				Bla g 7	1	1,5
42	Alérgeno de inseto	Veneno de abelha	<i>Apis mellifera</i>	Api m 1	12	1,7
43	Alérgenos de fungos	Fungo	<i>Alternaria alternata</i>	Alt a 1	3	3,8
44				Asp f 1	3	1,2
45				Asp f 3	1	7,6
46	Alérgenos de animais	Cão	<i>Canis familiaris</i>	Can f 1	3	9,5
47		Cavalo	<i>Equus caballus</i>	Equ c 3	9	1,4
48		Gato	<i>Felis catus</i>	Fel d 1	8	3,3
49				Fel d 4	1	5,5
50		Camundongo	<i>Mus musculus</i>	Mus m 1	1	4,1

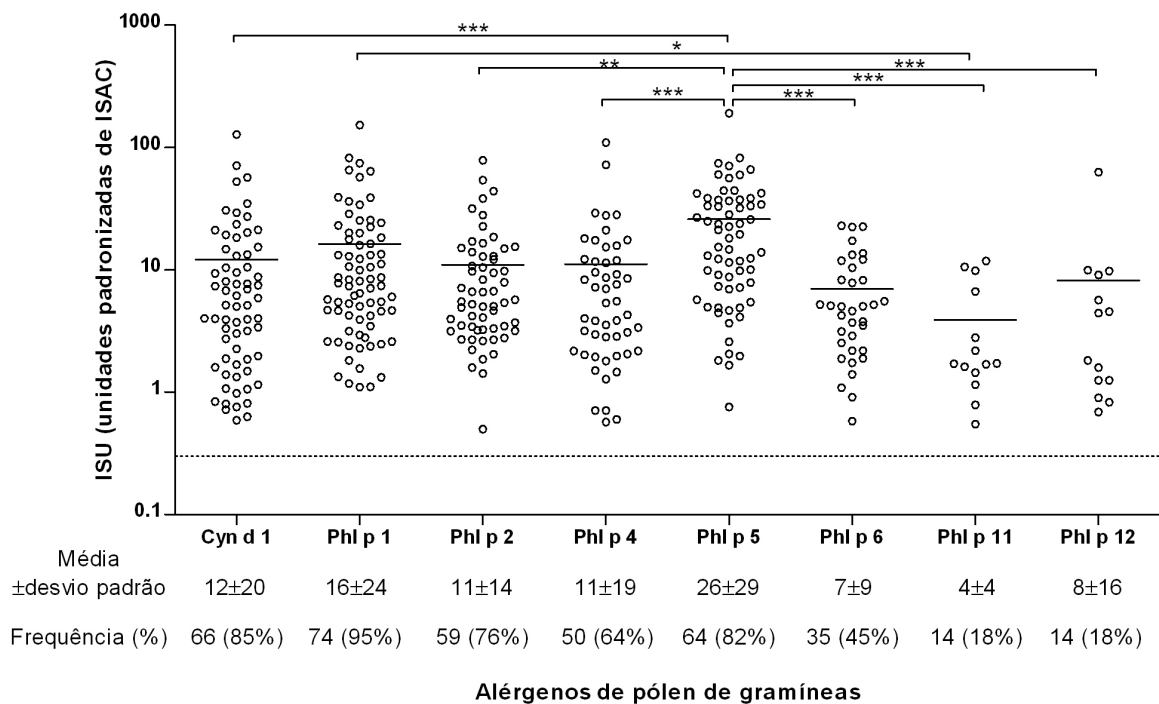


Figura 9. Níveis de anticorpos IgE específicos aos alérgenos de pólen de gramíneas, expressos em ISU (*ISAC Standardized Units* – Unidades padronizadas de ISAC®). A barra horizontal em cada coluna representa a média aritmética do ISU para cada alérgeno e a linha pontilhada representa o limiar de detecção do teste (ISU > 0,3). Média aritmética ± desvio padrão e frequência (%) de reconhecimento de cada alérgeno estão também apresentadas. * p<0,1, ** p<0,01, *** p<0,001.

5 Discussão

As gramíneas constituem um grupo muito grande e diverso de plantas composto de mais de 1.000 espécies individuais (KNOX, 1993). A alergia a pólen de gramíneas, um dos tipos mais comuns de alergia no mundo, é causada por diferentes espécies de gramíneas que coexistem geograficamente, especialmente em áreas de clima temperado, levando à múltipla sensibilização em indivíduos alérgicos. Além disso, a homogeneidade dos alérgenos das gramíneas em espécies filogeneticamente relacionadas pode gerar altos níveis de anticorpos que reagem cruzadamente, os quais se ligam a epítomos comuns nos alérgenos homólogos (ANDERSSON; LIDHOLM, 2003; FERREIRA et al., 2004).

Lolium multiflorum, gramínea encontrada na região Sul do Brasil, tem sido considerada a principal fonte de grãos de pólen responsáveis por reações alérgicas sazonais em áreas de ocorrência dessa gramínea (VIEIRA; FERREIRA; MATTER, 2005). No presente estudo, a resposta anticórpica IgE, IgG1 e IgG4 a antígenos de pólen da gramínea *Lolium multiflorum* foi analisada por ELISA, *immunoblotting*, e *microarray* de alérgenos, em amostras de soros provenientes de pacientes com polinose e indivíduos não atópicos residentes no sul do Brasil.

A seleção dos participantes do estudo foi realizada por meio de avaliação clínica e TCP. Com relação aos sintomas clínicos, no grupo de pacientes com polinose e TCP positivo ao extrato de pólen de *L. multiflorum*, denominado grupo Lm+, o sintoma clínico predominantemente observado foi rinite alérgica, seguido por conjuntivite e asma. Em recente estudo, o sintoma de rinite alérgica foi o diagnóstico mais frequentemente observado, tanto em pacientes com polinose quanto em pacientes sensibilizados a ácaros (BERNARDES et al., 2010). O sintoma de conjuntivite é característico de pacientes que apresentam polinose, uma vez que os alérgenos do grão de pólen ao entrarem em contato com a mucosa nasal e conjuntiva ocular podem desencadear sintomas relacionados à rinoconjuntivite alérgica (DUTRA; ROSÁRIO FILHO; ZAVADINIAK, 2001). Sopelete et al. (2006) também verificaram uma significativa frequência de conjuntivite em pacientes com polinose, uma vez que pacientes com polinose desenvolvem sintomas na conjuntiva nos estágios iniciais da estação de polinização de gramíneas (LIPIEC et al., 2005).

Alguns estudos desenvolvidos no Brasil restritos à região Sul que relataram a existência de polinose, são baseados em questionários clínicos e em testes cutâneos, empregando extratos de pólen de gramíneas diversas, muitas delas não cultivadas ou presentes na região (KURTZ, 1998). Bernardes et al. (2010) relataram que pacientes com rinite alérgica sazonal apresentaram alta concordância de resultados positivos ao TCP

utilizando extrato de pólen de *L. multiflorum* e extrato comercial Gramíneas II, que contém uma mistura de pólen de gramíneas e que é rotineiramente utilizado no diagnóstico e na imunoterapia da polinose no sul do Brasil. No entanto, maiores diâmetros médio de pápula e reatividade foram observados para o extrato de *L. multiflorum* quando comparado ao extrato Gramíneas II, sugerindo que o extrato de *L. multiflorum* seja mais sensível para ser utilizado no referido teste, principalmente em análises quantitativas, visto ser constituído de proteínas específicas do grão de pólen dessa espécie de gramínea (BERNARDES et al., 2010; SOPELETE et al., 2006).

Com relação ao teste cutâneo de puntura, no grupo Lm+ a positividade ao extrato de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{PBS}) foi maior que aos extratos de ácaros refletindo a importância dos alérgenos de pólen desta gramínea na sensibilização dos pacientes avaliados no estudo. Em recente estudo, ao se comparar por TCP a sensibilização entre pacientes com polinose e pacientes alérgicos a ácaros, Bernardes e colaboradores verificaram que a sensibilização a ácaros foi mais frequente em pacientes que não apresentavam polinose, sugerindo que os pacientes com rinoconjuntivite alérgica sazonal (polinose) apresentavam história clínica, principalmente de conjuntivite, relacionada à exposição à alérgenos de pólen de gramíneas e não a ácaros (BERNARDES et al., 2010).

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, (PLATTS-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).

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

diagnóstico como na avaliação clínica quando da necessidade de análise quantitativa mais precisa.

Dessa forma, a reatividade de anticorpos IgE, assim como de IgG1 e IgG4 séricos específicos a alérgenos de pólen de *L. multiflorum* foi avaliada por ELISA e *immunoblotting*, em amostras de soros de pacientes com polinose.

Os níveis de anticorpos IgE e IgG4 específicos a extrato de pólen de *L. multiflorum* foram significativamente maiores em pacientes com polinose. Assim, foi encontrada uma significativa diferença na positividade entre as classes e subclasses de anticorpos no grupo Lm+, com maior positividade para IgE, seguido por IgG4 e IgG1. Baixos níveis de anticorpos IgG1 foram encontrados nos pacientes com polinose. Os indivíduos não atópicos apresentaram baixos níveis de anticorpos específicos IgE e IgG4 aos componentes do extrato de *L. multiflorum*, sendo que uma maior positividade foi encontrada para anticorpos IgG1.

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%).

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. No entanto, alguns estudos têm considerado a importância dos anticorpos IgG1 e IgG4 específicos a alérgenos. Kenemy e colaboradores (1989) verificaram níveis semelhantes de anticorpos IgG1 específicos a ácaros da poeira domiciliar em indivíduos atópicos e não atópicos, similarmente ao observado por Pereira e colaboradores (2005) ao ácaro *Blomia tropicalis*.

Anticorpos IgG1 e IgG4 específicos aos alérgenos se destacam por possuírem uma capacidade bloqueadora capaz de inibir a ação da IgE, função esta relacionada à alta afinidade de ligação e maior concentração sérica, uma vez que tal atividade se dá por competição ao epítopo antigênico (VAN REE; AALBERSE, 1995; MEILER et al., 2008). A importância dos anticorpos IgG de alta afinidade é considerável, uma vez que investigações apontam que a presença dos mesmos, em especial IgG1 e IgG4, a alérgenos de pólen e de ácaros da poeira é muito mais comum em indivíduos alérgicos que

apresentam altos níveis de IgE alérgeno-específica do que em indivíduos não atópicos que não apresentam IgE específica (AALBERSE et al., 2009).

No intuito de esclarecer a distinção da base imunológica para a manifestação de um perfil distinto de subclasses de IgG específica a alérgenos, Martinez-Alonso, Coutinho e Agustin (1980) sugeriram que uma possível explicação é que cada tipo de alérgeno pode ser processado diferencialmente por células apresentadoras de antígenos, de tal forma que as células T *helper* desenvolvem um padrão especial de citocinas dirigido pelo alérgeno, controlando a expressão das subclasses de IgG, bem como a afinidade do anticorpo. Outro fator importante no direcionamento do processo de maturação da afinidade pode estar relacionado com exposições antigênicas repetidas e prolongadas (RAMOS et al., 2003; DEVEY; BECKMAN; KEMENY, 1993).

Recentemente, a função da subclasse IgG1 específica a alérgenos foi inversamente relacionada com a sensibilização de basófilos. Cady et al. (2009) demonstraram que os níveis de anticorpos IgG1 específicos aos alérgenos de epitélio de gato foram associados com diminuição da sensibilização de basófilos, independente dos níveis de IgE específicos, confirmando o papel protetor/bloqueador desta subclasse.

Correlações positivas foram encontradas principalmente entre os níveis de anticorpos IgE e IgG4, com associação duplo positiva de 79% e simples positiva de 21% apenas para IgE. Em um estudo sobre a sensibilização a pólen de bétula, 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). Assim, a resposta IgE parece ser mais importante no risco da doença atópica que os níveis de IgG4, sugerindo que anticorpos IgG4 possam ter um efeito imuno-modulador nos sintomas da rinoconjuntivite alérgica em crianças sensibilizadas ao pólen de bétula (KIHLSSTRÖM et al., 2005). Estes resultados indicam que os antígenos derivados de pólen de *L. multiflorum* estão envolvidos tanto na sensibilização alérgica (IgE), bem como na manutenção da homeostase (IgG1 e IgG4).

Em geral, o emprego de técnicas como SDS-PAGE e *immunoblotting* têm contribuído com a análise dos componentes presentes nos extratos de pólen de gramíneas, visto que permitem a identificação do número e da frequência de ligação de anticorpos IgE aos componentes antigênicos, presentes nos extratos alérgicos (BERNARDES et al., 2010; SOPELETE et al., 2006; NIEDERBERGER et al., 1998).

No presente trabalho, ao se analisar o perfil protéico do extrato de pólen de *Lolium multiflorum* (Lm_{PBS}) por SDS-PAGE, 20 frações protéicas foram identificadas com massas moleculares relativas no intervalo de 10 a 101 kDa. As frações mais evidentes foram as de 10, 16, 26, 29, 32, 54 e 57 kDa. Sopelete et al. (2006) identificaram frações de 15 a 114 kDa, e Bernardes et al. (2010) observaram frações protéicas variando de 14 a 116 kDa.

Ao se analisar o perfil dos componentes presentes no extrato de *L. multiflorum* ligantes de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4, por *immunoblotting*, o grupo de pacientes com polinose apresentou maior frequência de reatividade para todas as classes de imunoglobulinas. Com relação à reatividade IgE, os principais componentes reconhecidos foram de 26, 29 e 32 kDa que apresentaram 100% de frequência de reconhecimento. Este resultado está em concordância com um estudo realizado por Bernardes et al. (2010), no qual frações de 26, 28 e 32 kDa apresentaram uma frequência de reconhecimento de IgE maior que 92%. Frações de massa molecular de 28-30 e 31-34 também foram imunodominantes em estudo desenvolvido por Sopelete et al. (2006) em pacientes com polinose. Estes achados estão ainda em concordância com os relatados por Singh; Knox (1985) e Schäppi et al. (1999) que detectaram alérgenos de pólen dos grupos 1 constituído de glicoproteínas de 32-35 kDa e grupo 5 de proteínas não glicosiladas de 28-30 kDa, como os mais frequentes reconhecidos por pacientes alérgicos a pólen de gramíneas. Com relação aos alérgenos de pólen da gramínea *Phleum pratense*, os alérgenos Phl p 1 e Phl p 5 são considerados principais baseado na alta reatividade de anticorpos IgE direcionados a Phl p 1 (89%) e Phl p 5 (81%) em pacientes alérgicos a pólen de gramíneas (ANDERSON; LIDHOLM, 2003; ROSSI et al., 2000). Em estudo comparativo entre o reconhecimento de frações de pólen de *L. multiflorum* e de outras gramíneas, Schäppi et al. (1999), relataram que o anticorpo monoclonal 1D11, específico ao alérgeno Phl p 5, reconheceu a fração antigênica de 30 kDa em muitos grãos de pólen de gramíneas, inclusive de *L. perenne* e *L. multiflorum*, demonstrando a identidade alérgênica dessa fração entre espécies de gramíneas diversas.

As principais frações protéicas reconhecidas por anticorpos IgG1 foram as de 26, 29 e 32 kDa que apresentaram uma frequência de 97% de reatividade. Algumas frações foram reconhecidas principalmente por anticorpos IgG1 específicos, sendo o caso das frações de 12, 71, 80 e 101 kDa, com menor ou nenhuma reatividade a IgE e IgG4. Anticorpos IgG4 apresentaram reatividade predominante as frações de 26, 29, 32, 54 e 57 kDa. As frações comumente reconhecidas (>50%) pelas três classes de anticorpos em pacientes com polinose foram as de 26, 29, 32, 54 e 57 kDa.

Em recente estudo, componentes antigênicos de 55 e 66 kDa foram reconhecidos por anticorpos IgE da maioria dos pacientes com polinose (BERNARDES et al., 2010). Devido a sua frequência de reconhecimento e massa molecular aparente esse componente pode estar relacionado aos alérgenos dos grupos 4 e 13. Vários estudos demonstraram a importância clínica dos alérgenos dos grupos 4 e 13 de pólen de gramíneas (FAHLBUSCH et al., 1998; SUCK et al., 2000). Em extrato de pólen de *L. perenne*, Ekramoddoullah; Kisil; Schon (1983) caracterizaram Lol p 4 como uma proteína de 59 kDa, enquanto que para *P. pratense*, Fahlbusch et al. (1998), mostraram que Phl p 4 apresenta uma massa molecular de 55 kDa. Entretanto, alérgenos dos grupos 4 e 13 podem ser discriminados através de gel bidimensional seguido de *immunoblotting*, uma vez que apresentam pontos isoeletricos (pI) diferentes, como os descritos para Phl p 4, glicoproteína e pI de 9,4 e para Phl p 13, glicoproteína e pI de 7,5 (FAHLBUSCH et al., 1998; SUCK et al., 2000).

Sugere-se que o componente antigênico de baixa massa molecular de 10 kDa, reconhecido pelos pacientes com polinose, tanto para IgE (85%) quanto para IgG1 (82%), possa estar relacionado aos alérgenos dos grupos 2, 3 ou 10 que apresentam massa molecular variando de 10 a 12 kDa. Alérgenos dos grupos 2 e 3, foram anteriormente identificados como proteínas de aproximadamente 10-12 kDa (ANSARI; SHENBAGAMURTHI; MARSH, 1989) com diferentes pontos isoeletricos, um ácido outro básico, podendo assim serem discriminados em gel bidimensional e mesmo quantificados por técnica utilizando anticorpo monoclonal (MARTH et al., 2004).

Ao se utilizar anticorpos monoclonais e policlonais para a caracterização alérgica de extratos de pólen de *Lolium multiflorum* e *Phelum pratense*, alérgenos do grupo 1, 2, 5, 7, 12 e 13 foram detectados em ambos os extratos, enquanto que alérgeno do grupo 6 foi detectado somente no extrato de pólen de *Phleum pratense*. Sabe-se que alérgenos do grupo 6 foram identificados apenas nas gramíneas *Phleum pratense* e *Poa pratensis* (NIEDERBERGER et al., 1998; VRTALA et al., 1999).

Atualmente, extratos alérgicos contendo misturas variáveis de componentes alérgicos e não-alérgicos são utilizados para o diagnóstico *in vivo* e *in vitro* de alergia (HILLER et al., 2002). O uso de *microarrays* contendo componentes alérgicos definidos fornecem resultados rápidos com relação às reatividades IgE contra um amplo número de moléculas alérgicas baseado apenas em pequenas quantidades de soro, oferecendo um grande número de informações diagnósticas, às quais devem facilitar o diagnóstico e a terapia das doenças alérgicas (CONSTANTIN et al., 2009). Esta é a primeira vez que o diagnóstico baseado em componentes, utilizando alérgenos purificados recombinantes ou

naturais, é realizado em uma população de pacientes do sul do Brasil, alérgicos a pólen de gramíneas.

Em nosso estudo, usando um *chip* comercial (ISAC[®]) contendo 103 alérgenos diferentes, incluindo alérgenos de *Phleum pratense*, 98% dos pacientes reagiram a pelo menos um dos principais alérgenos de pólen de gramíneas Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5 ou Phl p 6. Nesta população, alérgenos de pólen de gramíneas são responsáveis pela maioria da reatividade IgE, enquanto outros alérgenos foram fracamente reconhecidos. Em um estudo realizado na África Central, alérgenos de ácaros e de grãos de pólen representaram as fontes alergênicas mais prevalentes. Quando alérgenos individuais recombinantes de grãos de pólen e ácaros foram usados, foram encontradas diferenças entre pacientes africanos e europeus, refletindo aspectos da exposição alergênica local (WESTRITSCHNIG et al., 2003).

Como esperado, alérgenos de grãos de pólen de gramíneas dos grupos 1 e 5 foram os mais reconhecidos na população estudada (Phl p 1, 95%; Cyn d 1, 85% e Phl p 5, 82%). Alérgenos do grupo 1 e 5 dominam a resposta imune aos extratos de pólen de gramíneas (ANDERSON; LIDHOLM, 2003). Os resultados mostraram uma alta reatividade a Cyn d 1, refletindo a sensibilização a *Cynodon dactylon*, uma gramínea que cresce no ambiente no qual os pacientes vivem (VIEIRA, 2003). Sabe-se que entre gramíneas taxonomicamente relacionadas existe uma extensiva reatividade cruzada (JOHANSEN et al 2009), com exceção da gramínea *Cynodon dactylon*, pertencente à subfamília Choridoideae que apresenta uma reatividade cruzada limitada com Pooideae (TIWARI; BHALLA; SINGH, 2009).

Apenas 45% dos pacientes estavam sensibilizados ao alérgeno Phl p 6, um dos alérgenos principais, cujo reconhecimento em soros de pacientes do hemisfério norte é de 75% (VRTALA et al., 1999). No presente estudo observou-se que, o extrato de pólen de *Lolium multiflorum* não apresenta o alérgeno do grupo 6 em quantidade detectável pelo *westernblotting* utilizando anticorpos específicos. Alérgenos do grupo 6 parecem ser exclusivos de *Phleum pratense* e *Poa pratensis*, mas são reconhecidos por anticorpos IgE de mais de 50% dos pacientes com alergia a gramíneas (PETERSEN et al., 1995). Assim, é justo aceitar o baixo reconhecimento de Phl p 6 por anticorpos IgE séricos da população estudada, sendo que a reatividade encontrada possa estar relacionada ao fato de que a sequência de aminoácidos de rPhl p 6 apresenta um alto grau de homologia de sequência com as porções N-terminais de alérgenos de pólen do grupo 5 (VRTALA et al., 1999). Além disso, o perfil de reconhecimento a Phl p 6 encontrado é compatível com uma

sensibilização primária a pólen de *Lolium multiflorum*, já que esse não possui alérgenos do grupo 6.

Na população estudada, não houve reconhecimento de IgE ao alérgeno Phl p 7, alérgeno do grupo de proteínas ligantes de cálcio do tipo EF-hand. De acordo com Niederberger et al. 1999, este alérgeno representa um notável alérgeno de reatividade cruzada de pólen, e pode ser empregado no diagnóstico e tratamento de pacientes atópicos que apresentam sintomas alérgicos pelo contato com grãos de pólen de muitas espécies de plantas não relacionadas. Por outro lado, os alérgenos Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 e Phl p 6 são tidos como marcadores específicos para a sensibilização a pólen de gramíneas (LAFFER et al., 1994).

Devido à presença de alérgenos de *Phleum pratense* no *microarray*, avaliou-se a reatividade cruzada entre extratos de pólen de *Lolium multiflorum* e *Phleum pratense*. Alérgenos purificados de *Phleum pratense* também foram empregados nos experimentos de inibição para investigar quais moléculas seriam responsáveis pela reatividade cruzada. Pelos ensaios de ELISA de inibição, foi encontrado um moderado nível de reatividade cruzada entre esses dois extratos. O extrato de pólen de *Phleum pratense* inibe cerca de 60% da ligação de IgE aos componentes do extrato *Lolium multiflorum*. Uma vez que grande parte da inibição pelo extrato de *Phleum pratense* se deve aos alérgenos contidos na molécula híbrida (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 e Phl p 6) (51%), essa seria uma ferramenta útil no diagnóstico de alergia a pólen de gramíneas nesta população. Com base nos resultados do *microarray* e do ELISA de inibição, alérgenos dos grupos 1, 2, 5 e 6 são os mais importantes com relação à sensibilização nesta população.

Por *immunoblotting*, o perfil de reatividade cruzada de IgE entre os extratos de pólen de *Lolium multiflorum* e *Phleum pratense* foi determinado para avaliar se haveria diferenças na ligação de IgE entre estes dois extratos. Os dados mostraram reatividade IgE predominantemente ao extrato de *Lolium multiflorum* em comparação com o extrato de *Phleum pratense*. A ligação de IgE ao extrato de *Lolium multiflorum* foi mais inibida na região de 12 kDa, principalmente quando os soros foram pré-incubados com o mix de alérgenos dos grupos 4 e 12 (Figura 7), indicando inibição de alérgenos do grupo 12 (14 kDa).

Na região de 50-67 kDa, onde os alérgenos do grupo 4 deveriam estar presentes, não houve inibição ao se utilizar o extrato de pólen de *Phleum pratense*, o mix contendo alérgenos dos grupos 1, 2, 5 e 6, e o mix de alérgenos dos grupos 4 e 12. Tal fato indica que no extrato de pólen *Lolium multiflorum* existe uma fração alergênica, com cerca de 50-67 kDa,

que não é inibida por alérgenos dos grupos 1, 2, 5, 6 e 4. Esta fração poderia ser um alérgeno do grupo 13 ou outro alérgeno de alto peso molecular. O diferente padrão no perfil de reconhecimento de IgE sugere que este alérgeno está presente em pouca quantidade no extrato de *Phleum pratense* ou este alérgeno pode não ser tão similar aos alérgenos de *Phleum pratense*, sendo mais relacionado aos alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum*. Estes dados sugerem que o extrato de pólen de *Lolium multiflorum* é mais potente ou é a fonte sensibilizante primária para esta população de pacientes.

Em conjunto, esses resultados estão de acordo com estudos de radioimunoensaio (RAST) de inibição e ELISA de inibição, com extratos brutos de grãos de pólen de gramíneas da subfamília Pooideae que demonstraram forte reatividade cruzada entre seus membros (BERSTEIN et al., 1976; MARTIN; MANSFIELD; NELSON, 1985; WEBER, 2003; LOVBORG, 1999; MOHAPATRA, LOCKEY; SHIRLEY, 2005). Sopelete et al. (2006) relataram a existência de reatividade cruzada entre extratos de pólen de gramíneas e *L. multiflorum*. Existem vários estudos sobre esta relação das gramíneas da família Poaceae, entre elas, principalmente *Lolium perenne* e *Phleum pratense*, relacionadas filogeneticamente a *L. multiflorum* (VAN REE et al., 1995; SUPHIOGLU et al., 1999; LAFFER et al., 1994; SUPHIOGLU, 2000).

Entretanto, apesar de se conhecer a ocorrência de alta reatividade cruzada entre extratos de pólen de diferentes espécies de gramíneas, alérgenos específicos a uma espécie ou subfamília podem ter um papel importante na sensibilização de determinados indivíduos, sendo que nesses casos, deve se ter muita precaução ao se considerar a reatividade cruzada entre alérgenos de grãos de pólen de gramíneas. É o caso dos alérgenos de pólen de *P. notatum* que mostraram limitada reatividade cruzada com alérgenos de *L. perenne* em pacientes sensíveis a este pólen, conforme relatado por Davies et al. (2005), que concluíram então que, deve-se considerar a utilização do extrato de *P. notatum* para o diagnóstico e tratamento de pacientes, com sintomas relacionados à época de florescimento desta gramínea.

Aliado a isso, já se demonstrou que extratos alergênicos contendo quantidades indefinidas de antígenos não alergênicos podem não apresentar a mesma resposta nos pacientes, quando comparado com extratos contendo alérgenos específicos, uma vez que sua potência biológica pode ser perdida devido à grande variabilidade de antígenos (VALENTA; NIEDERBERGER, 2007). Assim, a reatividade cruzada entre alérgenos de grãos de pólen de gramíneas deve ser bem avaliada, pois apresenta extrema importância na formulação dos extratos alergênicos podendo levar a reações adversas, especialmente nos

extratos contendo alérgenos de grãos de pólen de várias espécies de gramíneas, que ao final da preparação podem conter uma alta concentração de um mesmo grupo de alérgeno (WEBER, 2003).

Recentemente foi relatado que somente a gramínea *Phleum pratense* poderia ser suficiente para a imunoterapia específica contra alergia a pólen de gramíneas da família Pooideae (HEJL et al., 2009). Entretanto, os dados obtidos no presente estudo sugerem que na população estudada a principal fonte sensibilizante deve ser escolhida para imunoterapia.

Assim, quase 100% dos pacientes alérgicos a pólen de gramíneas puderam ser diagnosticados usando o *microarray* de componentes definidos de alérgenos. O pólen da gramínea *Lolium multiflorum* é a principal fonte de sensibilização para os pacientes alérgicos a grãos de pólen de gramíneas nesta população do sul do Brasil. Embora existam muitos estudos com relação aos alérgenos de pólen de *Phleum pratense*, mais estudos sobre *Lolium multiflorum* e seus principais alérgenos são necessários para produzir componentes mais específicos com o objetivo de tratar pacientes primariamente sensibilizados aos alérgenos de pólen desta gramínea.

6 Conclusões

- Os níveis de anticorpos IgE e IgG4 específicos ao extrato de pólen de *Lolium multiflorum* foram maiores em pacientes com polinose;
- Componentes antigênicos presentes no extrato de pólen de *Lolium multiflorum* são capazes de induzir uma resposta IgE, IgG1 e IgG4 em pacientes com polinose, além de resposta IgG1 e IgG4 em pacientes não atópicos, porém em níveis menores, sugerindo a importância dos antígenos presentes no extrato de pólen *L. multiflorum* tanto na sensibilização quanto na manutenção da homeostase em pacientes com polinose;
- Componentes antigênicos de 26, 29 e 32 kDa foram reconhecidos por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 em pacientes com polinose, com maior frequência para anticorpos IgE e IgG4;
- Um alto grau de reatividade cruzada entre alérgenos de extrato de pólen de *Lolium multiflorum* e *Phleum pratense* foi observado sugerindo que o diagnóstico de alergia possa ser realizado com alérgenos de *Phleum pratense* dentro da população estudada;
- O diagnóstico por *microarray* de componentes definidos de alérgenos revelou um perfil de reconhecimento IgE compatível com uma mono-sensibilização preferencial a alérgenos de pólen de *Lolium multiflorum*.

Referências Bibliográficas¹

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.

- 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.; AKKERDAAS, J. H.; VAN REE, R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. **Allergy**, Copenhagen, v. 56, n. 6, p. 478-90, 2001.
- 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.
- AALBERSE, R. C.; STAPEL, S. O.; SCHUURMAN, J.; RISPENS, T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 469-477, 2009.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5 ed. Philadelphia: Saunders, 2003, 562 p.
- AKDIS, C. A.; BLESKEN, T.; AKDIS, M.; WUTHRICH, B.; BLASER, K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 102, n. 1, p. 98-106, 1998.
- AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 119, n. 4, p. 780-791, 2007.
- ALLERGOME: Disponível em: <http://www.allergome.org/script/search_step2.php>. Acesso em 02 fev. 2010.
- ALMEIDA, K. C.; SILVA, D. A. O.; GENNARI-CARDOSO, M. L.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; ALVES, R.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Responses of IgE, IgG1, and IgG4 to concanavalin A-binding *Blomia tropicalis* antigens in allergic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 39, n. 11, p. 1445-1454, 2006.
- ANDERSON, K.; LIDHOLM, J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 130, n. 2, p. 87-107, 2003.
- ANGKASEKWINAI, P.; PARK, H.; WANG, Y. H.; WANG, Y. H.; CHANG, S. H.; CORRY, D. B.; LIU, Y. J.; ZHU, Z.; DONG, C. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 204, n. 7, p. 1509-1517, 2007.
- ANSARI, A. A.; SHENBAGAMURTHI, P.; MARSH, D. G. Complete primary structure of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p III: comparison with known Lol p I and II sequences. **Biochemistry**, Washington, v. 28, n. 21, p. 8665-8670, 1989.

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 dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 433-439, 1991.

ARRUDA, L. K.; FERRIANI, V. P.; VAILES, L. D.; POMÉS, A.; CHAPMAN, M. D. Cockroach allergens: environmental distribution and relationship to disease. **Current Allergy and Asthma Reports**, Philadelphia, v. 1, n. 5, p. 466-473, 2001.

ASHER, M. I.; MONTEFORT, S.; BJÖRKSTÉN, B.; LAI, C. K.; STRACHAN, D. P.; WEILAND, S. K.; WILLIAMS, H.; ISAAC PHASE THREE STUDY GROUP. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. **Lancet**, London, v. 368, n. 9537, p. 733-743, 2006.

BALL, T., W. R. SPERR, P. VALENT, J. LIDHOLM, S. SPITZAUER, C. EBNER, D. KRAFT, R. VALENTA. Induction of antibody responses to new B cell epitopes indicates vaccination character of allergen immunotherapy. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 29, n. 6, p. 2026-2036, 1999.

BARNES, K. C.; MARSH, D. G. The genetics and complexity of allergy and asthma. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 19, n. 7, p. 325-332, 1998.

BARTRA, J.; SASTRE, J.; DEL CUVILLO, A.; MONTORO, J.; JÁUREGUI, I.; DÁVILA, I.; FERRER, M.; MULLOL, J.; VALERO, A. From Pollinosis to Digestive Allergy. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Barcelona, v. 19, s. 1, p. 3-10, 2009.

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.

BEASLY R. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. **Lancet**, London, v. 25, n. 351, p. 1225-1232, 1998.

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.; TOMCZOK, J.; SLIWA-TOMCZOK, W.; KASCHE, A.; EBNER VON ESCHENBACH, C.; BECKER, W.-M.; RING, J. Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen as allergen carriers and initiators of an allergic response. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 118, p. 414-418, 1999.

- BEHRENDT, H.; BECKER, W. M. Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 13, n. 6, p. 709-715, 2001.
- BEHRENDT, H.; 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.
- BERNARDES, C. T.; MOREIRA, P. F.; SOPELETE, M. C.; VIEIRA, F. A.; SUNG, S. S.; SILVA, D. A.; TAKETOMI, E. A. IgE cross-reactivity between *Lolium multiflorum* and commercial grass pollen allergen extracts in Brazilian patients with pollinosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 166-175, 2010.
- BERSTEIN, I. L.; PERERA, M.; GALLAGHER, J.; MICHAEL, J. G.; JOHANSSON, S. G. In vitro cross-allergenicity of major aeroallergenic pollens by the radioallergosorbent technique. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 57, n. 2, p. 141-152, 1976.
- BERNSTEIN, I. L.; STORMS, W. W. Practice parameters for allergy diagnostic testing. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, Arlington, v. 75, n. 6 Pt 2, p. 543-625, 1995.
- BETTELLI, E.; KORN, T.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. **Nature**, London, v. 453, n. 7198, p. 1051-1057, 2008.
- 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. A WHO position paper. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 102, n. 4 Pt 1, p. 558-562, 1998.
- BOUSQUET, P. J.; CHATZI, L.; JARVIS, D.; BURNEY, P. Assessing skin prick tests reliability in ECRHS-I. **Allergy**, Copenhagen, v. 63, n. 3, p. 341-346, 2008.
- 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.
- CADY, C. T.; POWELL, M. S.; HARBECK, R. J.; GICLAS, P. C.; MURPHY, J. R.; KATIAL, R. K.; WEBER, R. W.; HOGARTH, P. M.; JOHNSON, S.; BONVINI, E.; KOENIG, S.; CAMBIER, J. C. IgG antibodies produced during subcutaneous allergen immunotherapy mediate inhibition of basophil activation via a mechanism involving both FcγRIIA and FcγRIIB. **Immunology Letters**, Amsterdam v. 130, n. 1-2, p. 57-65, 2009.
- CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. Medidas de biossegurança em laboratório. EDUFU: Uberlândia, 1997, 55p.

CONSTANTIN, C.; QUIRCE, S.; POORAFSHAR, M.; TOURAEV, A.; NIGGEMANN, B.; MARI, A.; EBNER, C.; AKERSTRÖM, H.; HEBERLE-BORS, E.; NYSTRAND, M.; VALENTA, R. Micro-arrayed wheat seed and grass pollen allergens for component-resolved diagnosis. **Allergy**, Copenhagen, v. 64, n. 7, p. 1030-1037, 2009.

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

CROMWELL, O. Biochemistry of allergens. In: KAY, A.B. **Allergy and allergic diseases**, Oxford: Blackwell Science Ltd., v. 2, p. 797-810, 1997.

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.

DEVEY, M. E.; BECKMAN, S.; KEMENY, D. M. The functional affinities of antibodies of different IgG subclasses to dietary antigens in mothers and their babies. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 94, n.1, p. 117-121, 1993.

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.

DEWITT, A. M.; ANDERSSON, K.; PELTRE, G.; LIDHOLM, J. Cloning, expression and immunological characterization of full-length timothy grass pollen allergen Phl p 4, a berberine bridge enzyme-like protein with homology to celery allergen Api g 5. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 77-86, 2006.

DREBORG, S. Skin tests used in type I allergy testing – Position paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. **Allergy**, Copenhagen, v. 44, s. 10, p. 1-59, 1989.

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

DUFFORT, O.; QUINTANA, J.; IPSEN, H.; BARBER, D.; POLO, F. Antigenic similarity among group 1 allergens from grasses and quantitation ELISA using monoclonal antibodies to Phl p 1. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 145, n. 4, p. 283-290, 2008.

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.

DYKEWICZ, M. S.; FINEMAN, S. Executive summary of joint task force practice parameters on diagnosis and management of rhinitis. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 81, p. 463-468, 1998.

- EKRAMODDOULLAH, A. K. M.; KISIL, F. T.; SEHON, A. H. Immunochemical characterization of a high molecular weight basic allergen (HMBA) of rye grass (*Lolium multiflorum*) pollen. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 465-473, 1983.
- ESTEVEES, 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.
- FAHLBUSCH, B.; HORNUNG, D.; HEINRICH, J.; DAHSE, H. M.; JAGER, L. Quantification of group 5 grass pollen allergens in house dust. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 30, n. 11, p. 1645-1652, 2000.
- FERREIRA, F.; HAWRANEK, T.; GRUBER, P.; WOPFNER, N.; MARI, A. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. **Allergy**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 243-267, 2004.
- FLICKER, S.; VALENTA, R. Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 132, n.1, p. 13-24, 2003.
- FOCKE, M.; MARTH, K.; FLICKER, S.; VALENTA, R. Heterogeneity of commercial timothy grass pollen extracts. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 38, n. 8, p. 1400-1408, 2008.
- FORD, S. A.; BALDO, B. A. A re-examination of ryegrass (*Lolium perenne*) pollen allergens. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 81, n. 5, p. 193-203, 1986.
- FORT, M. M.; CHEUNG, J.; YEN, D.; LI, J.; ZURAWSKI, S. M.; LO, S.; MENON, S.; CLIFFORD, T.; HUNTE, B.; LESLEY, R.; MUCHAMUEL, T.; HURST, S. D.; ZURAWSKI, G.; LEACH, M. W.; GORMAN, D. M.; RENNICK, D. M. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. **Immunity**, Cambridge, v. 15, n. 6, p. 985-995, 2001.
- FREIDHOFF, L. R.; EHRLICH-KAUTZKY, E.; GRANT, J. H.; MEYERS, D. A.; MARSH, D. G. A study of the human immune response to *Lolium perenne* (rye) pollen and its components, Lol p I and Lol p II (rye I and rye II). I. Prevalence of reactivity to the allergens and correlations among skin test, IgE antibody, and IgG antibody data. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 78, n. 6, p. 1190-1201, 1986.
- GELLER, M.; ESCH, R. E.; FERNANDEZ-CALDAS, E. Sensibilização acarina na atopia respiratória do Rio de Janeiro – considerações preliminares. **Anais da Academia Nacional de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 153, p.174-175, 1993.
- GRIFFITH, I. J.; SMITH, P. M.; POLLOCK, J.; THEERAKULPISUT, P.; AVJIOGLU, A.; DAVIES, S.; HOUGH, T.; SINGH, M. B.; SIMPSON, R. J.; WARD, L. D.; KNOX, R. B. Cloning and sequencing of Lol p I, the major allergenic protein of rye-grass pollen. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 279, n. 2, p. 210-215, 1991.

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

GRÖNLUND, H.; BERGMAN, T.; SANDSTROM, K.; ALVELIUS, G.; REININGER, R.; VERDINO, P.; HAUSWIRTH, A.; LIDEROT, K.; VALENT, P.; SPITZAUER, S.; KELLER, W.; VALENTA, R.; VAN HAGE-HAMSTEN, M. Formation of disulfide bonds and homodimers of the major cat allergen Fel d 1 equivalent to the natural allergen by expression in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 41, p. 40144-40151, 2003.

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

HARWANEGG, C.; LAFFER, S.; HILLER, R.; MUELLER, M. W.; KRAFT, D.; SPITZAUER, S.; VALENTA, R. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 7-13, 2003.

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.

HEJL, C.; WURTZEN, P. A.; KLEINE-TEBBEW, J.; JOHANSEN, N.; BROGE, L.; IPSEN, H. *Phleum pratense* alone is sufficient for allergen-specific immunotherapy against allergy to Pooideae grass pollens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 752-759, 2009.

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.

HESELMAR, B.; ABERG, B.; ERIKSSON, B.; BJORKSTÉN, B.; ABERG, N. Building characteristics affect the risk of allergy development. **Pediatric Allergy and Immunology**, Copenhagen, v. 16, n. 2, p. 126-131, 2005.

HILLER, R.; LAFFER, S.; HARWANEGG, C.; HUBER, M.; SCHMIDT, W. M.; TWARDOSZ, A.; BARLETTA, B.; BECKER, W. M.; BLASER, K.; BREITENEDER, H.; CHAPMAN, M.; CRAMERI, R.; DUCHÊNE, M.; FERREIRA, F.; FIEBIG, H.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; KING, T. P.; KLEBER-JANKE, T.; KURUP, V. P.; LEHRER, S. B.; LIDHOLM, J.; MÜLLER, U.; PINI, C.; REESE, G.; SCHEINER, O.; SCHEYNIUS, A.; SHEN, H. D.; SPITZAUER, S.; SUCK, R.; SWOBODA, I.; THOMAS, W.; TINGHINO, R.; VAN HAGE-HAMSTEN, M.; VIRTANEN, T.; KRAFT, D.; MÜLLER, M. W.; VALENTA, R. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 16, n. 3, p. 414-416, 2002.

HOLGATE, S.T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 8, p. 218-230, 2008.

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.

HURST, S. D.; MUCHAMUEL, T.; GORMAN, D. M.; GILBERT, J. M.; CLIFFORD, T.; KWAN, S.; MENON, S.; SEYMOUR, B.; JACKSON, C.; KUNG, T. T.; BRIELAND, J. K.; ZURAWSKI, S. M.; CHAPMAN, R. W.; ZURAWSKI, G.; COFFMAN, R. L. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 169, n. 1, p. 443-453, 2002.

IKEDA, K.; NAKAJIMA, H.; SUZUKI, K.; KAGAMI, S.; HIROSE, K.; SUTO, A.; SAITO, Y.; IWAMOTO, I. Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. **Blood**, New York, v. 101, n. 9, p. 3594-3596, 2003.

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.

I.U.I.S. União Internacional das Sociedades de Imunologia. Disponível em: <<http://www.allergen.org/>>. Acesso em 02 fev. 2010.

IVANOV, I. I.; MCKENZIE, B. S.; ZHOU, L.; TADOKORO, C. E.; LEPELLEY, A.; LAFAILLE, J. J.; CUA, D. J.; LITTMAN, D. R. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, Cambridge, v. 126, n. 6, p. 1121-1133, 2006.

JEANNIN, P.; LECOANET, S.; DELNESTE, Y.; GAUCHAT, J. F.; BONNEFOY, J. Y. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 160, n. 7, p. 3555-3561, 1998.

JOHANSEN, N.; WEBER, R. W.; IPSEN, H.; BARBER, D.; BROGE, L.; HEJL, C. Extensive IgE cross-reactivity towards the Pooideae grasses substantiated for a large number of grass-pollen-sensitized subjects. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 150, n. 4, p. 325-34, 2009.

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.

JOHANSSON, S. G.; BIEBER, T.; DAHL, R.; FRIEDMANN, P. S.; LANIER, B. Q.; LOCKEY, R. F.; MOTALA, C.; ORTEGA MARTELL, J. A.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; RING, J.; THIEN, F.; VAN CAUWENBERGE, P.; WILLIAMS, H. C. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 113, n. 5, p. 832-836, 2004.

JUTEL, M.; AKDIS, M.; BUDAK, F.; AEBISCHER- CASALTA, C.; WRZYSZCZ, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 33, n. 5, p. 1205-1214, 2003.

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

KARAMLOO, F.; SCHMID-GRENDELMEIER, P.; KUSSEBI, F.; AKDIS, M.; SALAGIANNI, M.; VON BEUST, B. R.; REIMERS, A.; ZUMKEHR, J.; SOLDATOVA, L.; HOUSLEY-MARKOVIC, Z.; MÜLLER, U.; KÜNDIG, T.; KEMENY, D. M.; SPANGFORT, M. D.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Prevention of allergy by a recombinant multi-allergen vaccine with reduced IgE binding and preserved T cell epitopes. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 35, n. 11, p. 3268-3276, 2005.

KAZEMI-SHIRAZI, L.; NIEDERBERGER, V.; LINHART, B.; LINDHOLM, J.; KRAFT, D.; VALENTA, R. Recombinant marker allergens: diagnostic gatekeepers for the treatment of allergy. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 127, n. 4, p. 259-268, 2002.

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.

KIM, M. R.; MANOUKIAN, R.; YEH, R.; SILBINGER, S. M.; DANILENKO, D. M.; SCULLY, S.; SUN, J.; DEROSE, M. L.; STOLINA, M.; CHANG, D.; VAN, G. Y.; CLARKIN, K.; NGUYEN, H. Q.; YU, Y. B.; JING, S.; SENALDI, G.; ELLIOTT, G.; MEDLOCK, E. S. Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. **Blood**, New York, v. 100, n. 7, p. 2330-2340, 2002.

KNOX, R. B.; TAYLOR, P.; SMITH, P.; HOUGH, T.; ONG, E. K.; SUPHIOGLU, C.; LAVITHIS, M.; DAVIES, S.; AVJIOGLU, A.; SINGH, M. Pollen allergens: Botanical aspects. In: Kraft D, Schon A editors. **Molecular Biology and Immunology of Allergens**. Boca Raton: CRC Press, p. 31-38, 1993.

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.

KOLLS, J. K.; KANALY, S. T.; RAMSAY, A. J. Interleukin-17: an emerging role in lung inflammation. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, New York, v. 28, n. 1, p. 9-11, Jan. 2003.

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

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

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

LINDÉN, A.; LAAN, M.; ANDERSON, G. P. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 25, n. 1, p. 159-172, 2005.

LING, E. M.; SMITH, T.; NGUYEN, X. D.; PRIDGEON, C.; DALLMAN, M.; ARBERY, J.; CARR, V. A.; ROBINSON, D. S. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. **Lancet**, London, v. 363, n. 9409, p. 608–615, 2004.

LINHART B, HARTL A, JAHN-SCHMID B, VERDINO P, KELLER W, KRAUTH MT, VALENT P, HORAK F, WIEDERMANN U, THALHAMER J, EBNER C, KRAFT D, VALENTA R. A hybrid molecule resembling the epitope spectrum of grass pollen for allergy vaccination. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 5, p. 1010-1016, 2005.

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

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

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

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

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

MARTINEZ-ALONSO, C.; COUTINHO, A.; AGUSTIN, A. A. Immunoglobulin G-gene expression. I. The commitment to IgG subclass of secretory cells is determined by the quality of the non-specific stimuli. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 10, n. 9, p. 698-702, 1980.

MASTRANDREA, F.; SERIO, G.; MINARDI, A.; CORADDUZZA, G.; ROSSI, N.; SCARCIA, G.; MAIETTA, G.; IACOBELLI, A.; LAMANNA, C.; TURSI, A. IgE responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* native major allergens Der p 1 and Der p 2 during long-term specific immunotherapy. **Allergy**, Copenhagen v. 52, n. 11, p. 1115-1119, 1997.

MEILER, F.; KLUNKER, S.; ZIMMERMANN, M.; AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. **Allergy**, Copenhagen, v. 63, n. 11, p. 1455-1463, 2008.

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.

MOTHES, N.; HEINZKILL, M.; DRACHENBERG, K. J.; SPERR, W. R.; KRAUTH, M. T.; MAJLESI, Y.; SEMPER, H.; VALENT, P.; NIEDERBERGER, V.; KRAFT, D.; VALENTA, R. Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 1198-1208, 2003.

MOTHES, N.; HORAK, F.; VALENTA, R. Transition from a botanical to a molecular classification in tree pollen allergy: implications for diagnosis and therapy **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 135, n. 4, p. 357-373., 2004.

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.

NANDAKUMAR, S.; MILLER, C. W.; KUMARAGURU, U. T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. **Clinical and Molecular Allergy**, London, v. 7, p. 5, 2009.

NATHAN, R. A. The burden of allergic rhinitis. **Allergy and Asthma Proceedings**, Providence, v. 28, n. 1, p. 3-9, 2007.

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

NIEDERBERGER, V.; HAYEK, B.; VRTALA, S.; LAFFER, S.; TWARDOSZ, A.; VANGELISTA, L.; SPERR, W. R.; VALENT, P.; RUMPOLD, H.; KRAFT, D.; EHRENBERGER, K.; VALENTA, R.; SPITZAUER, S. Calcium-dependent immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound form of a cross-reactive two EF-hand timothy grass pollen allergen, Phl p 7. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 13, n. 8, p. 843-853, 1999.

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

OWNBY, D. R. Allergy testing: in vitro versus in vivo. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 35, n. 5, p. 995-1009, 1988.

- PALOMARES, O.; SWOBODA, I.; VILLALBA, M.; BALIC, N.; SPITZAUER, S.; RODRIGUEZ, R.; VALENTA R. The major allergen of olive pollen Ole e 1 is a diagnostic marker for sensitization to Oleaceae **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 141, n. 2, p. 110-118, 2006.
- PAULI, G. Allergens: the role of recombinant allergens. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 123, n. 3, p. 183-95, 2000.
- PEREIRA, E. A.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; ALMEIDA K. C.; ALVES, R.; SUNG, S. S.; TAKETOMI, E. A. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. **Allergy**, Copenhagen, v. 60, n. 3, p. 401-406, 2005.
- PERFETTI, L.; FERRARI, M.; GALDI, E.; POZZI, V.; COTTICA, D.; GRIGNANI, E.; MINOIA, C.; MOSCATO, G. House dust mites (Der p 1, Der f 1), cat (Fel d 1) and cockroach (Bla g 2) allergens in indoor work-places (offices and archives). **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 328, n. 1-3, p.15-21, 2004.
- 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.
- PETERSEN, A.; SUCK, R.; LINDNER, B.; GEORGIEVA, D.; ERNST, M.; NOTBOHM, H.; WICKLEIN, D.; CROMWELL, O.; BECKER, W. M. Phl p 3: Structural and immunological characterization of a major allergen of timothy grass pollen. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 840-849, 2006.
- PETERSEN, A.; BUFE, A.; SCHLAACK, M.; BECKER, W. M. Characterization on the major allergen group VI in timothy grass pollen (Phl p 6). I. Immunological and biochemical studies. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 108, n. 1, p. 49-54, 1995.
- PIPKORN, U.; HAMMARLUND, A.; ENERBACK, L. Prolonged treatment with topical corticosteroids results in an inhibition of the allergen-induced wheal-and-flare response and a reduction in skin mast cell numbers and histamine content. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 19-25, 1989.
- PITTMER, G.; VRTALA, S.; THOMAS, W. R.; WEGHOFFER, M.; KUNDI, M.; HORAK, F.; KRAFT, D.; VALENTA, R. Component-resolved diagnosis of housedust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 597-603, 2004.
- 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. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 89, n. 5, p. 1046-1060, 1992.
- PLATTS-MILLS, T. A. E.; VAUGHAN, J. W.; BLUMENTHAL, K.; POLLART SQUILLACE, S.; SPORIK, R. B. Serum IgG and IgG4 antibodies to Fel d 1 among children exposed to 20 microg Fel d 1 at home: relevance of a nonallergic modified Th2 response. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 124, n. 1-3, p.126-129, 2001b.

PLATT'S-MILLS, T. A. E.; VAUGHAN, J.; SQUILLACE, S.; WOODFOLK, J.; SPORIK, R. Sensitisation, 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, 2001a.

PLATT'S-MILLS, T. A. E.; VERVLOET, D.; THOMAS, W.; ALBERSE, R.; CHAPMAN, M. Indoor allergens and asthma. Report of a Third International Workshop. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 100, S. 6, p. S1-S24, 1997.

PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 117, n. 2, supplement 2, p. S450-S456, 2006.

RAMOS, J. D.; TEO, A. S.; OU, K. L.; TSAI, L. C.; LEE, B. W.; CHEONG, N.; CHUA, K. Y. Comparative allergenicity studies of native and recombinant *Blomia tropicalis* Paramyosin (Blo t 11). **Allergy**, Copenhagen, v. 58, n. 5, p. 412-419, 2003.

REININGER, R.; SWOBODA, I.; BOHLE, B.; HAUSWIRTH, A. W.; VALENT, P.; RUMPOLD, H.; VALENTA, R.; SPITZAUER, S. Characterization of recombinant cat albumin. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 33, n. 12, p. 1695-1702, 2003.

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.; PLATT'S-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.

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.; COCO, G.; SILVESTRO, L.; OPERTI, D. Evaluation of serum IgG4 antibodies specific to grass pollen allergen components in the follow up of allergic patients undergoing subcutaneous and sublingual immunotherapy. **Vaccine**, Amsterdam, v. 25, n. 5, p. 957-964, 2007.

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.

ROSSI, R. E.; MONASTEROLO, G.; OPERTI, D.; LUCCHESI, S.; OPERTI, R. Distribution of specific serum IgE to recombinant pollen allergens (rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5 and rBet v 2) and their relationship to each other and to their natural counterparts in patients allergic to grass pollen. **Allergology International**, Carlton, v. 49, p. 93–97, 2000.

SALLUSTO, F.; QUINTIERI, F.; PUGLIESE, O.; REALE, G.; PINI, C.; DIFELICE, G. T-cell and antibody response to *Parietaria judaica* allergenic fractions in atopic and nonatopic individuals. **Allergy**, Copenhagen v. 48, p. 37–44, 1993.

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

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

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

SEGUNDO, G. R. S.; SOPELETE, M. C.; TERRA, S. A.; PEREIRA, F. L.; JUSTINO, C. M.; SILVA, D. A. O.; TAKETOMI, E. A. Diversity of allergen exposure: Implications for the efficacy of environmental control. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 75, n. 2, p. 311–316, 2009.

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

SILVA, D. A. O.; GERVÁSIO, A. M.; SOPELETE, M. C.; ARRUDA-CHAVES, E.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; SUNG-SANG, J. S.; TAKETOMI, E. A. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 86, n. 5, p. 545–550, 2001.

SIMONS, E. (Ed): *Ancestors of Allergy*. New York: New York Global Medical Communications Ltd.; 1994.

SINGH, M. B.; HOUGH, T.; THEERAKULPISUT, P.; AVJIOGLU, A.; DAVIES, S.; SMITH, P. M.; TAYLOR, P.; SIMPSON, R. J.; WARD, L. D.; MCCLUSKEY, J.; PUY, R.;

KNOX, R. B. Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: intracellular targeting to the amyloplast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 4, p. 1384-1388, 1991.

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

SINGH, M. B.; SMITH, P. M.; KNOX, R. B. Molecular biology of rye-grass pollen allergens. **Monographs in Allergy**, Basel, v. 28, p. 101-120, 1990.

SLOTT, R. I.; ZWEIMAN, B. A Controlled study of the effect of corticosteroids on immediate skin test reactivity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 54, n. 4, p. 229-234, 1974.

SLY, R. M. Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 82, n. 3, p. 233-248, 1999.

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

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

SOLOMON, W. R. Aerobiology of pollinosis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 74, n. 4 Pt 1, p. 449-461, 1984.

SOLOMON, W.R.; PLATTS-MILLS, T.A.E. Aerobiology and inhalant allergens. In: MIDDLETON, E.; REED, C. E.; ELLIS, E. F.; ADKINSON, N. F. JR.; YUNGINGER, J. W.; BUSSE, W. W., editors. **Allergy: principles and practice**, St. Louis, USA: Mosby-Year Book, p. 469-528, 1993.

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

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

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

STUMVOLL, S.; WESTRITSCHNIG, K.; LIDHOLM, J.; SPITZAUER, S.; COLOMBO, P.; DURO, G.; KRAFT, D.; GERACI, D.; VALENTA, R. Identification of crossreactive and genuine *Parietaria judaica* pollen allergens. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 111, n. 5, p. 974-979, 2003.

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

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

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

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

TAMBORINI, E.; FACCINI, S.; LIDHOLM, J.; SVENSSON, M.; BRANDAZZA, A.; LONGHI, R.; GRÖNLUND, H.; SIDOLI, A.; AROSIO, P. Biochemical and immunochemical characterization of recombinant allergen Lol p 1. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 249, n. 3, p. 886-894, 1997.

TIWARI, R.; BHALLA, P. L.; SINGH, M. B. Evaluation of molecular basis of cross reactivity between rye and Bermuda grass pollen allergens. **Allergology International**, Carlton, v. 58, n. 4, p. 557-64, 2009.

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

TRAIDL-HOFFMANN, C.; JAKOB, T.; BEHRENDT, H. Determinants of allergenicity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 123, n. 3, p. 558-566, 2009.

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

TURKELTAPUCB, G.; ERGENP, J. The risk of adverse reactions from percutaneous prick-puncture allergen skin testing, venepuncture, and body measurements: data from the Second National Health and Nutrition Examination Survey 1976-80 (NHANES 11). **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 84, n. 6 Pt 1, p. 886-890, 1989.

VALENTA, R.; FERREIRA, F.; FOCKE-TEJKL, M.; LINHART, B.; NIEDERBERGER, V.; SWOBODA, I.; VRTALA, S. From allergen genes to allergy vaccines. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 28, p. 211-241, 2010.

VALENTA, R.; LIDHOLM, J.; NIEDERBERGER, V.; HAYEK, B.; KRAFT, D.; GRÖNLUND, H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 29, n. 7, p. 896-904, 1999.

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

VAN 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 NEERVEN, R. J.; WIKBORG, T. ; LUND, G.; JACOBSEN, B.; BRINCH-NIELSEN, A.; ARNVED, J.; IPSEN, H. Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 163, n. 5, p.2944-2952, 1999.

VAN REE, R.; AALBERSE, R. C. Demonstration of carbohydrate specific immunoglobulin G4 antibodies in sera of patients receiving grass pollen immunotherapy. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 106, n. 2, p. 146-148, 1995.

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. **The 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.

VRTALA, S.; FISCHER, S.; GROTE, M.; VANGELISTA, L.; PASTORE, A.; SPERR, W. R.; VALENT, P.; REICHEL, R.; KRAFT, D.; VALENTA, R. Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 163, n. 10, p. 5489-5496, 1999.

VRTALA, S.; FOCKE, M.; KOPEC, J.; VERDINO, P.; HARTL, A.; SPERR, W. R.; FEDOROV, A. A.; BALL, T.; ALMO, S.; VALENT, P.; THALHAMER, J.; KELLER, W.; VALENTA, R. Genetic engineering of the major timothy grass pollen allergen, Phl p 6, to reduce allergenic activity and preserve immunogenicity. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 179, n. 3, p. 1730-1739, 2007.

WANG, Y. H.; LIU, Y. J. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 20, n. 6, p. 697-702, 2008.

WANG, Y. H.; ANGKASEKWINAI, P.; LU, N.; VOO, K. S.; ARIMA, K.; HANABUCHI, S.; HIPPE, A.; CORRIGAN, C. J.; DONG, C.; HOMEY, B.; YAO, Z.; YING, S.; HUSTON, D. P.; LIU, Y. J. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 204, n. 8, p. 1837-1847, 2007.

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

WESTRITSCHNIG, K.; SIBANDA, E.; THOMAS, W.; AUER, H.; ASPÖCK, H.; PITTMER, G.; VRTALA, S.; SPITZAUER, S.; KRAFT, D.; VALENTA, R. Analysis of the sensitization profile towards allergens in central Africa. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 22-27, 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.

WILLIAMS, L. W. Allergy Skin Tests: Use and Interpretation. In: CASTRO, M.; KRAFT, M. **Clinical Asthma**. Elsevier: 2008.

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.

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

Anexos

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“Caracterização da resposta anticórpica IgE, IgG1 e IgG4 específica às principais frações antigênicas derivadas de pólen de *Lolium multiflorum* (Lam. 1779)”** sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Ernesto Akio Taketomi. Neste projeto buscamos determinar a alergia aos componentes do grão de pólen de azevém, visando à melhoria no diagnóstico e tratamento destas doenças alérgicas.

Durante esta pesquisa, o atendimento médico será realizado no Ambulatório de Alergia do Hospital de Clínicas da UFU, Campus Umuarama 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, e os exames de sangue serão realizados no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da UFU, MG. Procedimentos complementares, como teste alérgico e coleta de sangue (cerca de 15mL, ou 1 colher das de sopa, em adultos e 5 mL, ou 1 colher das de chá, em crianças) para análise de anticorpos específicos a outros alérgenos inaláveis, também serão realizados.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados desta pesquisa serão publicados, mas a sua identidade será totalmente preservada.

Você não terá nenhum ônus e ganho financeiro por participar desta pesquisa.

Os riscos são mínimos, mas a realização dos testes alérgicos pode, às vezes, causar as próprias crises alérgicas. Caso isso aconteça, você será imediatamente examinado por médicos assistentes e receberá tratamento adequado no Pronto Socorro do Hospital de Clínicas da UFU em Uberlândia, MG ou na Clínica de Alergia do Dr. Francisco Vieira em Caxias do Sul, RS. Dentre os benefícios pode ser a possível descoberta, em longo prazo, de um tratamento eficaz para o controle das alergias respiratórias, assim como melhoria no diagnóstico dessas doenças alérgicas.

Você terá a garantia de receber resposta a qualquer pergunta, ou esclarecimento a qualquer dúvida em relação aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com esta pesquisa. Você é livre para se retirar da pesquisa a qualquer momento em que desejar sem necessidade prévia de explicações, e sem nenhum prejuízo.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você ou responsável do paciente.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com Dr. Ernesto Taketomi em Uberlândia ou Dr. Francisco Vieira em Caxias do Sul:

Dr. Ernesto A. Taketomi
Avenida Pará, 1720 Bloco 4C, Campus Umuarama
Universidade Federal de Uberlândia
Uberlândia, MG
Tel.: (34)3218-2195 / Telefax: (34) 3218-2333

Dr. Francisco Vieira
Rua Os 18 do Forte, 2000 – Cjto 304
Bairro Centro
Caxias do Sul, RS
Tel.: (54) 3221-4777 / Telefax (54) 3221-4934

CEP/UFU: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco J, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394531

_____, ____ de _____ de 200 ____.

Assinatura dos pesquisadores

Eu, _____, membro da equipe deste projeto, solicito que você assine este termo caso você aceite participar deste projeto, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da Pesquisa

Anexo 2



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: cep@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 555/08 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO
REGISTRO CEP/UFU 063/08

Projeto Pesquisa: Caracterização da resposta anticórpica IgE, IgG1 e IgG4 específica às principais frações antigênicas derivadas de pólen de *Iolium multiflorum* (Lam. 1779).

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo de pesquisa não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

ENTREGA DE RELATÓRIO PARCIAL: dezembro de 2009.
ENTREGA DE RELATÓRIO FINAL: dezembro de 2010.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 07 de novembro de 2008.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). 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.