PATRÍCIA OLAYA PASCHOAL

**Reatividade a múltiplas proteínas da dieta em crianças com alergia
ao leite de vaca mediada pela imunoglobulina E**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Programa de: Pediatria

Orientadora: Prof.^a Dra. Cristina Miuki Abe Jacob

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2011

PATRÍCIA OLAYA PASCHOAL

Reatividade a múltiplas proteínas da dieta em crianças com alergia ao
leite de vaca mediada pela imunoglobulina E

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Prof^a Dra. Cristina Miuki Abe Jacob

São Paulo

2011

PATRÍCIA OLAYA PASCHOAL

Reatividade a múltiplas proteínas da dieta em crianças com alergia ao
leite de vaca mediada pela imunoglobulina E

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Prof^a Dra. Cristina Miuki Abe Jacob

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Paschoal, Patrícia Olaya

Reatividade a múltiplas proteínas da dieta em crianças com alergia ao leite de vaca mediada pela imunoglobulina E / Patrícia Olaya Paschoal. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientadora: Cristina Miuki Abe Jacob.

Descritores: 1.Hipersensibilidade alimentar 2.Leite de vaca 3.Reatividade 4.Sementes 5.Proteínas 6.Imunoglobulina G 7.Imunoglobulina E

USP/FM/DBD-317/11

*Quando a gente acha que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas ..."*

Luis Fernando Veríssimo

DEDICATÓRIA

Dedicatória

A meus familiares

À minhas filhas que eu amo tanto e que tudo que faço sempre é nelas que
penso em primeiro lugar

Esse trabalho é pra elas!

Agradecimentos

Agradeço a Dra Cristina que apesar da distância sempre me atendeu com carinho e dedicação.

À amiga e mestre Dra Gerlinde pelos ensinamentos e por ter me aberto portas que me fizeram crescer profissionalmente e como pessoa.

A todos do Grupo de Imunologia Gastrointestinal da Universidade Federal Fluminense pela ajuda no trabalho desenvolvido.

À minha querida amiga Paula que compartilhou de perto todas as dificuldades e ansiedades geradas pela confecção de uma tese.

Aos professores e amigos Antonio Fidalgo e Marcio Ramos pela ajuda nos momentos finais.

À querida amiga Mônica Dalmacio que esteve sempre ao meu lado me encorajando e me valorizando.

A todos os professores e alunos do Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da USP que sempre me receberam com muito respeito, em especial ao Dr. Pastorino, à Dra Letícia e à Glauce.

À Adriana Trindade pela ajuda e esclarecimento de todos os trâmites legais facilitando o trabalho quando se está a alguns quilômetros de distância.

À Marinalva, da biblioteca da Faculdade de Medicina da USP pela atenção e compreensão.

Agradeço a Deus por ter colocado todas estas pessoas no meu caminho e por estar realizando algo tão difícil e tão desejado.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
ALV	Alergia ao Leite de Vaca
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EAACI	European Academy of Allergy and Clinical Immunology
NIAID	Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas
AA	Alergia Alimentar
Treg	Célula T regulatória
TPODCPC	Teste de provocação oral duplo cego placebo controlado
DII	Doença Inflamatória Intestinal
CDER	Departamento de Saúde e Pesquisa Farmaceutica
FDA	Food and Drugs Administration
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
DCPC	Duplo cego placebo controlado
BSA	Bovine Serum Albumin
LV	Leite de Vaca
Th1	Célula T helper 1
Th2	Célula T helper 2
MALT	Sistema Imunológico Associado às Mucosas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Nomenclatura das Reações Adversas aos Alimentos (EAACI, 2001). 2

Figura 2 - Distribuição da amostra de pacientes incluídos neste estudo. 12

Figura 3 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgG específicos anti-amendoim (*Arachis hypogea*) de pacientes alérgicos a LV, tolerantes a LV e controles. 22

Figura 4 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgE específicos anti-amendoim (*Arachis hypogea*) de pacientes alérgicos a LV, tolerantes a LV e controles. 23

Figura 5 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgG específicos anti-feijão fradinho (*Vigna unguiculata*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles 24

Figura 6 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgE específicos anti-feijão fradinho (*Vigna unguiculata*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles 25

Figura 7 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgG específicos anti-feijão roxinho (*Phaseolos vulgaris*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles. 26

Figura 8 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgE específicos anti-feijão roxinho (*Phaseolos vulgaris*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles. 27

Figura 9 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgG específicos anti-milho (*Zea mays*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles. 28

Figura 10 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgE específicos anti-milho (*Zea mays*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles. 29

Figura 11 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgG específicos anti-ervilha (*Pisum sativum*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles. 30

Figura 12 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgE específicos anti-ervilha (*Pisum sativum*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles. 31

Figura 13 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgG específicos anti-lentilha (*Lens esculenta*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles. 32

Figura 14 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgE específicos anti-lentilha (*Lens esculenta*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles. 33

Figura 15 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgG específicos anti-soja (*Glycine max*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles. 34

Figura 16 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgE específicos soja (*Glycine max*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles. 35

Figura 17 - Dispersão dos pacientes alérgicos para as sete sementes analisadas para reatividade a IgG 36

Figura 18 - Dispersão dos pacientes tolerantes para as sete sementes analisadas para reatividade a IgG 37

Figura 19 - Dispersão dos pacientes controles para as sete sementes analisadas para reatividade a IgG 38

Figura 20 - Dispersão dos pacientes alérgicos para as sete sementes analisadas para reatividade a IgE 39

Figura 21 - Dispersão dos pacientes tolerantes para as sete sementes analisadas para reatividade a IgE 40

Figura 22 - Dispersão dos pacientes controles para as sete sementes analisadas para reatividade a IgE 41

Figura 23 – Média das concentrações de IgG entre os pacientes alérgicos e tolerantes em relação ao grupo controle – soja42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diluição da solução padrão e fases da dosagem de proteína 17

Tabela 2 - Diluição dos extratos salino e borato 18

Tabela 3 - Diluição das amostras e fases da dosagem de proteína 18

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Alergia alimentar	1
1.2	Alergia ao Leite de Vaca	6
1.2.1	Reatividade dos anticorpos IgG a alimentos da dieta	7
2	Objetivos	10
2.1	2.1 .Geral	10
2.2	2.2 Específicos	10
3	Casuística	12
3.1	Distribuição amostral	12
3.2	Figura 2 - Distribuição da amostra de pacientes incluídos neste estudo. 12	
3.3	População de estudo:	12
3.3.1	PACIENTES COM ALV	13
3.3.2	Associados a todos os itens descritos abaixo:	13
3.3.3	PACIENTES TOLERANTES	14
3.3.4	Critérios para definição de tolerância ao leite de vaca:	14
3.3.5	GRUPO CONTROLE	15
4	Métodos	16
4.1	Local da pesquisa	16
4.2	Preparo do extrato antigênico alimentar:	16
4.3	Dosagem de proteína obtida nos extratos	17
4.3.1	Preparo dos reagentes	17
4.3.2	Elaboração da curva padrão	17
4.4	ELISA	19

4.5	Estatística	20
5	Resultados	22
5.1	Reatividade a proteínas de sementes	22
6	Discussão	44
7	Conclusão	54
8	Bibliografia	56

RESUMO

PASCHOAL PO. Reatividade a múltiplas proteínas da dieta em crianças com alergia ao leite de vaca mediada pela imunoglobulina E. (Tese). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011. 78p.

Objetivos: Determinar a reatividade dos soros e determinação dos isotipos IgG e IgE a proteínas de sementes da dieta de crianças com alergia ao leite de vaca IgE mediada. **Métodos:** Foram avaliados soros de três grupos de crianças: alérgicas ao leite de vaca IgE mediada, crianças tolerantes ao leite e um grupo controle com crianças não atópicas. Foram usados extratos protéicos de diferentes tipos de sementes utilizando o teste de ELISA para análise da reatividade dos isotipos IgG e IgE. **Resultados:** Comparando as concentrações séricas de IgG dos diferentes grupos, observou-se concentrações mais elevadas e estatisticamente significante no grupo alérgico em relação aos grupos tolerante e controle, exceto para as sementes de soja e feijão roxinho. Em relação ao isotipo IgE observou-se os mesmos padrões de reatividade mostradas nas análises para IgG, com diferença significativa do grupo alérgico em relação ao controle, exceto para milho. Observou-se que para a soja houve grande dispersão das concentrações séricas tanto no grupo alérgico quanto no tolerante, em valores superiores ao do grupo controle. **Conclusão:** A comparação entre os diversos grupos avaliados mostra que pacientes alérgicos ao leite e os tolerantes apresentam concentrações mais elevadas de IgG e IgE a outros alimentos que as crianças do grupo controle, o que pode sugerir possível alteração de permeabilidade da mucosa intestinal nestes grupos, mesmo na ausência de sintomatologia gastrointestinal.

Descritores: Hipersensibilidade alimentar, leite de vaca, sementes, proteínas, imunoglobulina G, imunoglobulina E.

ABSTRACT

PASCHOAL PO. Reactivity to multiple protein diet in children with cow's milk allergy mediated by immunoglobulin E (Thesis). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011. 78p.

Objective: To determine the reactivity of serum and determination of IgG and IgE isotypes to seed proteins included in the diet of children with cow's milk allergy IgE mediated. **Methods:** We evaluated sera from three groups of children: cow's milk allergic patients, tolerant children and a control group with non-atopic children. It was used protein extracts from different types of seeds using an ELISA assay to analyze the reactivity of IgG and IgE isotypes. **Results:** Comparing the IgG serum from different groups, it was observed higher concentrations and statistically significant in the allergic group compared to the tolerant and control groups, except for soybeans and kidney beans. To the IgE isotype it was observed the same patterns of reactivity shown in the analysis for IgG, with significant difference in the allergic group compared to control, except for corn. It was observed that for soybeans there were values of serum, both in the allergic and tolerant group higher than in the control group. **Conclusion:** Our study showed that the allergic and tolerant groups of CMA patients presented higher IgG and IgE concentrations to many seeds than the control group. These findings may suggest possible changes in permeability intestinal mucosa in these groups.

Descriptors: food hypersensitivity, cow's milk, reactivity, seeds, proteins, immunoglobulin G, immunoglobulin E.

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Alergia alimentar

A alergia alimentar é distinta de outras reações adversas aos alimentos por apresentar um mecanismo fisiopatológico que envolve o sistema imunológico. De acordo com o tipo de mecanismo, IgE mediado ou não, podemos ter reações clínicas específicas, tais como anafilaxia nos IgE mediados e sintomas gastrintestinais nos não-IgE mediados (Eigenmann, 2008).

As alergias alimentares têm merecido especial atenção tanto pelo aumento de prevalência na faixa etária pediátrica, como pela interferência na qualidade de vida dos pacientes e familiares.

O aumento na prevalência de alergias alimentares pode ser decorrente, de maior conscientização de pais e familiares quanto aos sintomas ou da melhoria na identificação da doença através de testes diagnósticos mais específicos, cabendo aos pesquisadores analisar criticamente as evidências disponíveis e responder a este questionamento (Reisacher *et al*, 2011).

Reações adversas aos alimentos incluem qualquer reação anormal aos alimentos e pela grande dificuldade quanto à nomenclatura destas reações, em 2001 a *European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (EAACI) publicou um consenso sobre a terminologia de reações adversas, definindo hipersensibilidade alimentar (alergia alimentar) e hipersensibilidade alimentar não-alérgica (tradicionalmente chamado “intolerância alimentar”) conforme figura 1 (Johansson *et al*, 2001). Em 2010, o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID), trabalhando com 34 organizações profissionais, agências federais, e grupos de defesa do paciente, liderou o desenvolvimento de diretrizes clínicas para o diagnóstico e tratamento da alergia alimentar. Estas orientações destinam-se a ser utilizadas por uma grande variedade de profissionais de saúde, incluindo médicos de família, clínicos e profissionais de enfermagem. Os tópicos

abordados neste consenso incluem a epidemiologia, história natural, diagnóstico, o tratamento de sintomas graves e anafilaxia. Estas Diretrizes fornecem 43 recomendações clínicas concisas e orientações adicionais sobre os pontos de controvérsia atual no manejo do paciente. Os autores também tiveram como proposta, identificar lacunas no conhecimento científico atual, que poderão ser abordadas através de pesquisas futuras (Boyce *et al*, 2010).

Figura 1 - Nomenclatura das Reações Adversas aos Alimentos (EAACI, 2001).

A alergia alimentar (AA) é uma resposta imunológica adversa a proteínas alimentares e os sintomas frequentemente envolvem além do trato gastrointestinal, o trato respiratório e a pele (Ahrens *et al*, 2008). Embora as reações alérgicas mediadas por (IgE) sejam aquelas mais facilmente detectáveis, porque se caracterizam pela rápida manifestação dos sintomas clínicos como urticária, broncoespasmo e eventualmente anafilaxia, esta não é a única forma de alergia. Reações alérgicas também podem ser mediadas por células T, com manifestações clínicas mais tardias, tornando mais difícil correlacionar a ingestão

do alimento e o diagnóstico da alergia alimentar (Nowak-Węgrzyn, 2006). Sabe-se hoje que a fisiopatologia da alergia alimentar é o resultado de uma complexa rede de interações genéticas e epigenéticas influenciadas pelas características do indivíduo e o meio ambiente. O tipo de alimentação, as formas de contato com o mundo microbiológico, a época de administração de alérgenos alimentares e o padrão de permeabilidade da mucosa intestinal influenciam a regulação celular e molecular do sistema imunológico levando a diferentes modelos de resposta imunológica ao alimento. Entre as características genéticas, o polimorfismo dos genes associados à resposta imunológica e a falha na atividade de células T regulatórias (Treg) têm maior destaque nas pesquisas envolvendo alergias alimentares (Sampson *et al*, 1999 e Prescott *et al*, 2010).

A alergia alimentar é mais comum na infância, provavelmente em decorrência da imaturidade tanto dos processos digestivos quanto imunológicos, uma vez que em muitos casos este processo regride e o indivíduo se torna tolerante ao alimento. Este fato provavelmente ocorre conseqüente à maturação destes processos, durante o desenvolvimento da criança (Sporik *et al*, 2008; Eigenmann, 2009). Normalmente, os alérgenos alimentares são glicoproteínas que são relativamente resistentes à digestão e a cocção. Um grande número de alérgenos alimentares já foram identificados e caracterizados como por exemplo, caseína (Bos d 8), β -lactoglobulina (Bos d 5) do leite, ovomucoide [Gal d 1] no ovo e *Arachis hypogaea* 1 [Ara h 1] no amendoim. Em cada uma destas proteínas, epítomos específicos (componentes estruturais da molécula do antígeno) foram mapeados e interagem com anticorpos IgE específicos ou receptores de células T (Allen *et al*, 2006).

Nas crianças, os alimentos mais associados à AA são leite de vaca, soja, ovo, trigo e amendoim, sendo este último mais observado nos Estados Unidos (Sampson, 1999). Estes alimentos apresentam propriedades físico-químicas e estruturais importantes, que mantêm parte de suas proteínas intactas mesmo após os processos de cocção e digestivos, provavelmente em decorrência da estabilidade dos epítomos envolvidos na reatividade clínica (Simpson, 2008; Herman *et al*, 2003).

A história natural da alergia alimentar ao ovo, às proteínas do leite e à soja é geralmente caracterizada por remissões ainda na infância. Embora, as alergias ao amendoim, nozes e peixes tipicamente persistam até a idade adulta, alguns casos com início em idade precoce, mostrando baixas concentrações de IgE específica e sintomas menos graves podem desenvolver tolerância (Zeiger, 2003).

O leite contém mais de 40 proteínas e todas elas podem ser potencialmente alergênicas, sendo os três principais alérgenos conhecidos a β -lactoglobulina (que não existe no leite humano), a α -lactoalbumina e a caseína (Avila *et al*, 2005).

A alergia ao leite de vaca tem sido descrita como uma das alergias alimentares mais comuns em crianças (Pourpak *et al*, 2004). Entre adultos jovens, 3 a 6% podem permanecer com alergia às proteínas do leite de vaca caracterizada pela permanência dos sintomas gastrintestinais (Pelto *et al*, 1999; Paajanen *et al*, 2007).

Embora não haja, no momento, testes genéticos diagnósticos disponíveis para identificar indivíduos com risco de alergia, fatores genéticos estão claramente associados à alergia aos alimentos (Sicherer *et al*, 2010).

A maior prevalência de alergia alimentar está associada a fatores de risco tais como: história familiar ou pessoal de atopia, distúrbios gastrintestinais com alterações da permeabilidade e fatores dietéticos associados (Garside *et al*, 2004; Björkstén, 2005).

Na última década tem se dado mais atenção aos mecanismos de alergia alimentar envolvendo sintomas que afetem o trato gastrintestinal do que no passado, em particular as que têm mecanismos não mediados por IgE. A sensibilização a múltiplas proteínas da dieta da criança e a sensibilização a antígenos presentes no leite da mãe durante o aleitamento exclusivo têm sido descritas como as principais causas de alergias não mediadas por IgE nas últimas décadas (Murch *et al*, 2000).

Alergia alimentar não mediada por IgE é mais comum na primeira infância. O diagnóstico desta alergia é mais difícil, podendo ser apenas definido por ocasião da biópsia intestinal (Holloway *et al*, 2011).

Segundo o Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar (2007), muito se discute sobre outros mecanismos de hipersensibilidade não mediados por IgE, porém, as evidências que dão respaldo ao seu papel são restritas, sendo a resposta de hipersensibilidade celular tipo IV (induzida por células) a resposta que participa de várias reações aos alimentos, como nas enterocolites e nas enteropatias induzidas por proteínas alimentares.

Alergia alimentar é diagnosticada com base em critérios clínicos, com uma abordagem que envolve anamnese, testes laboratoriais relacionados à detecção de IgE específica aos alimentos suspeitos e teste de provocação oral duplo cego placebo controlado (TPODCPC) com estes mesmos alimentos. Nos casos não IgE mediados utiliza-se o teste de provocação também e às vezes, a biópsia intestinal. Tentativas de dietas de exclusão sequenciais para diversos alimentos têm sido cada vez mais abandonadas para evitar a exclusão de alimentos da dieta de forma desnecessária (Kim, 2008; Sicherer *et al*, 2010).

O TPODCPC é o teste considerado padrão ouro para os casos de alergia alimentar, entretanto, este teste somente deverá ser realizado em local apropriado com estrutura adequada e profissionais treinados e competentes para que os riscos para os pacientes sejam minimizados (Williams *et al*, 1999; Niggemann *et al*, 2007). Este teste pode ainda nos dar as doses do alimento para desencadear as reações alérgicas e a determinação da aquisição da tolerância (Williams *et al*, 1999).

A alergia alimentar pode ser potencialmente fatal e afeta seriamente a qualidade de vida do indivíduo e seus familiares (Sicherer *et al*, 2010).

A presença de uma doença alérgica aumenta significativamente o risco de desenvolver outras doenças alérgicas afetando diversos sistemas orgânicos (Simpson *et al*, 2008).

A indução de tolerância por via digestiva depende da dose administrada, da frequência e intervalo entre as exposições antigênicas, das condições imunológicas, idade do animal ou indivíduo, entre outros fatores. Susan Prescott e colaboradores (2010) propuseram a existência de uma janela imunológica onde a

criança é mais susceptível à indução de tolerância, que ocorreria entre 4 e 7 meses de idade.

Tem sido demonstrado em modelos animais que a introdução precoce de antígenos heterólogos em neonatos (proteínas de outras espécies animais ou vegetais) por via oral não induz a tolerância oral, mas normalmente tornam os animais alérgicos para o mesmo antígeno. Isto ocorre principalmente quando não há concomitância com o aleitamento materno. Estudo de Miller e colaboradores (1994) mostrou que animais expostos à clara de ovo pela via digestiva, nos primeiros meses de lactação, ficam alérgicos apresentando títulos inversamente proporcionais à idade da primeira exposição. O período de lactação é fundamental para o amadurecimento do sistema imunológico de mucosas e a introdução de uma proteína heteróloga numa fase inicial do período de lactação pode aumentar a suscetibilidade às alergias alimentares. Em conclusão, quanto mais jovem for a primeira exposição oral (antes dos 3 meses de idade) maiores as chances de se sensibilizar com a proteína heteróloga (Miller *et al*, 1994; Paschoal *et al*, 2009).

1.2 Alergia ao Leite de Vaca

Entre todas as alergias alimentares da criança, a alergia ao leite de vaca é a mais importante e pode se apresentar através de dois mecanismos: IgE mediado com manifestações imediatas ou não IgE mediado, com manifestações tardias (Caffarelli *et al*, 2010).

O tratamento da ALV, independentemente do tipo clínico, é a eliminação da dieta das proteínas do leite de vaca e substituição com fórmulas hipoalergênicas (Sampson, 1999; Chapman *et al*, 2006).

O papel da exposição a antígenos alimentares através do leite materno é intrigante, porque pode resultar tanto na imunização como na tolerância.

Na alergia ao leite de vaca se observa às vezes, alergias a outros alimentos, podendo indicar que durante este processo pode fazer alterações da permeabilidade intestinal, mesmo sem alterações digestivas evidentes.

A sensibilização a múltiplas proteínas em pacientes alérgicos ao leite de vaca IgE mediado pode indicar um processo inflamatório intestinal sub clínico que pode constituir um fator de risco para o desenvolvimento de novas alergias. Uma vez que se entendam mais profundamente os mecanismos envolvidos nos processos de sensibilização, podem-se sugerir novas condutas terapêuticas incluindo dietas paciente-específico.

1.2.1 Reatividade dos anticorpos IgG a alimentos da dieta

A reatividade a múltiplas proteínas da dieta ainda é um assunto pouco explorado pela literatura científica. Os indivíduos, em geral, são expostos a grande quantidade de alérgenos alimentares durante a vida e a grande maioria destes apresenta anticorpos séricos de vários isotipos de imunoglobulinas. A presença de tais anticorpos é considerada um fenômeno normal, identificando proteínas alimentares da dieta, que são ingeridas.

Fatores específicos e inespecíficos, tais como ativação de citocinas, genética, fatores ambientais, higiene, padrão social, fatores climáticos, estresse, e alimentação, foram associados à indução e/ou exacerbação de doenças como alergia alimentar e doença inflamatória intestinal (DII). Bentz e colaboradores relataram que frequentemente, pacientes que apresentam sintomas de doença inflamatória intestinal (DII), são orientados a eliminar alguns alimentos da dieta, pois há evidências de que as reações a alimentos mediadas pela IgG, com uma resposta mais tardia, tem sido implicadas em casos de hipersensibilidade alimentar, piorando o quadro clínico de doenças inflamatórias intestinais. No entanto, estas conclusões ainda geram controvérsia, pois, a resposta IgG para alimentos é fisiológica e está presente em indivíduos aparentemente saudáveis. Por outro lado, uma avaliação *in vitro* mostrou que títulos de IgG total contra componentes alimentares e a resposta de células T para antígenos alimentares aumentada em relação as concentrações consideradas fisiológicas podem desempenhar um papel importante no início ou ainda perpetuação das doenças inflamatórias intestinais (Bentz *et al*, 2010).

Drisko e colaboradores (2006) mostraram ensaios paralelos de anticorpos IgG e IgE para alimentos e mofo fornecendo uma abordagem que tem importância para a clínica da alergia alimentar. Depois da identificação de níveis séricos de anticorpos elevados para alimentos específicos, o paciente foi colocado em uma dieta de eliminação destes alimentos por duas a quatro semanas, após a qual os alimentos que não provocam reações mediadas por IgE foram sistematicamente sendo incluídos na dieta um de cada vez. Demonstrando que há diminuição da proliferação da resposta de linfócitos, melhores resultados clínicos, e diminuição da liberação de mediadores inflamatórios seguindo dieta de eliminação do alimento em questão (Drisko *et al*, 2006). Mais recentemente se passou a valorizar altas concentrações séricas destes anticorpos, pela possibilidade que estes possam representar fenômenos biológicos, tais como uma forma de alergia alimentar não IgE mediada ou mesmo uma alteração da permeabilidade intestinal, em especial quando são encontradas altas concentrações de IgG a alimentos rotineiramente ingeridos.

Pacientes com ALV apresentam, em alguns casos, múltipla sensibilização a alimentos com proteínas alergênicas, o que representa um risco de maior gravidade para este paciente. A análise de múltiplas reatividades a proteínas da dieta em pacientes com ALV poderiam ser avaliadas como um risco para desenvolvimento de novas alergias alimentares ou mesmo um indício de alteração da permeabilidade intestinal nestes pacientes.

Com estes questionamentos, elaborou-se esta tese que visa contribuir para a melhor compreensão dos diferentes mecanismos fisiopatológicos da ALV IgE mediada pela avaliação dos anticorpos IgG a múltiplas proteínas da dieta e avaliar se esta reatividade poderia ter um papel na diferenciação dos pacientes com ALV de diferentes grupos evolutivos.

OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 2.1 .Geral

Avaliar a reatividade dos isotipos das imunoglobulinas G e E às proteínas de sementes da dieta no soro de pacientes com alergia ao leite de vaca IgE mediada

2.2 2.2 Específicos

Comparar a reatividade dos isotipos IgG e IgE às proteínas de sementes da dieta no soro dos pacientes com alergia ao leite de vaca persistente com aqueles tolerantes e com um grupo controle de crianças não atópicas

MÉTODOS

3 Casuística

3.1 Distribuição amostral

3.2 Figura 2 - Distribuição da amostra de pacientes incluídos neste estudo.

Foram utilizados 40 soros da soroteca do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Os soros eram de 16 crianças comprovadamente alérgicas ao leite de vaca, 14 crianças classificadas como tolerantes ao leite de vaca (vide critério 3.2.2) e 10 crianças não atópicas que foram encaminhadas com suspeita de alergia ao leite de vaca ao ambulatório de alergia alimentar, cujo diagnóstico foi excluído.

3.3 População de estudo:

Os soros eram provenientes de crianças atendidas no ambulatório de alergia alimentar da Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do

HCFMUSP. Todos os familiares destes pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido na realização desta soroteca. Foram constituídos três grupos de pacientes para fins de comparação:

3.3.1 PACIENTES COM ALV

Esta amostra consiste de 16 pacientes com idade maior que 5 anos, com ALV IgE mediada persistente, em seguimento no referido ambulatório., que preenchiam os seguintes critérios de inclusão:

ALV persistente aos 5 anos de idade com diagnóstico de alergia ao leite de vaca mediada por IgE diagnosticada nos 2 primeiros anos de vida, utilizando os seguintes critérios:

Histórico clínico compatível, associado a:

Anafilaxia relacionada à ingestão de leite de vaca.

Teste de provocação oral DCPC positivo ao desencadeamento pelo leite de vaca, em pacientes não anafiláticos

3.3.2 Associados a todos os itens descritos abaixo:

História familiar ou individual de atopia

Manifestação clínicas que ocorriam até 2 horas após a ingestão de leite, sendo consideradas aquelas reconhecidamente associadas a este mecanismo, entre elas: anafilaxia, urticária, angioedema, agudização de dermatites e broncoespasmo. O critério para definição de anafilaxia foi aquele de (Wang, 2007) referente ao *Second Symposium on the definition and management of anaphylaxis*".

Presença de IgE específica para LV ou pelo menos uma das suas frações (alfalactoalbumina, betalactoglobulina ou caseína), pelos seguintes métodos:

ImmunoCAPTM (Pharmacia Diagnostics;Uppsala, Sweden), realizado conforme metodologia detalhada pelo fornecedor (Axan R et al, 1988), sendo consideradas como relacionadas ao diagnóstico de AA, aquelas concentrações $\geq 3,5 \text{ kU}_A/\text{L}$.

Teste de hipersensibilidade cutânea pela técnica do prick teste, realizado segundo (Dreborg, 1993), usando lancetas de plástico

descartáveis, padronizadas para o teste com extratos para leite de vaca e frações (IPI-ASAC, Espanha). O teste foi realizado no antebraço da criança, utilizando controle negativo (diluyente) e controle positivo histamina (1mg/ml). O critério de positividade estabelecido foi uma pápula > 3 mm acima do controle negativo (Host et al, 2002).

A leitura foi realizada após 20 minutos e medidas foram realizadas no maior diâmetro da pápula, com régua específica para o teste.

Teste de provocação oral DCPC positivo ao leite de vaca nos pacientes não anafiláticos,

Os critérios de exclusão foram:

Pacientes com diagnóstico de gastroenterite aguda ou qualquer doença gastrointestinal diagnosticada nos últimos 3 meses anteriores à inclusão no estudo.

Pacientes em uso de quimioterápicos e/ou imunossupressores.

3.3.3 PACIENTES TOLERANTES

Este grupo é composto por 14 Crianças com histórico de alergia alimentar que desenvolveram tolerância às proteínas do leite de vaca evidenciado por ausência de sintomatologia clínica e não resposta ao teste DCPC, em seguimento no Ambulatório de Alergia Alimentar da Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança (HC-FMUSP).

3.3.4 Critérios para definição de tolerância ao leite de vaca:

O critério utilizado para definição de tolerância foi baseado em SKRIPAK JM et al , 2008, considerando-se :

Não resposta ao Teste de Provocação DCPC com leite de vaca. O teste de provocação DCPC foi realizado em pacientes que apresentavam no mínimo 2 anos sem reatividade clínica ou quando a família referia contato involuntário com o leite de vaca, sem sintomatologia associada com o episódio .

Não resposta ao teste de provocação oral aberto ou introdução do leite de vaca em domicílio por familiares, com boa tolerabilidade, sem reatividade clínica.

3.3.5 GRUPO CONTROLE

Consiste de 10 pacientes encaminhados ao do ambulatório de Alergia Alimentar da Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança (HC-FMUSP) por apresentarem sintomatologia que os pais atribuíam à alergia ao leite de vaca. Este diagnóstico foi excluído em todos estes pacientes pelo fato das crianças não apresentarem antecedentes pessoais ou familiares de atopia, ausência de evidências clínico-laboratoriais de atopia e história clínica não relacionada à ingestão do leite de vaca.

4 Métodos

4.1 Local da pesquisa

Foram avaliados soros da soroteca de pacientes com Alergia Alimentar do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e análises dos soros foram realizadas no Instituto de Imunobiologia da Universidade Federal Fluminense – RJ. Todo material utilizado foi processado pela própria pesquisadora com a colaboração de alunos do departamento de Imunobiologia da UFF.

4.2 Preparo do extrato antigênico alimentar:

Foram preparados extratos protéicos de sementes de amendoim (*Arachis hypogea*), lentilha (*Lens esculenta*), feijão fradinho (*Vigna unguiculata*), feijão roxinho (*Phaseolus vulgaris*), ervilha (*Pisum sativum*), milho (*Zea mays*) e soja (*Glycine max*). As proteínas foram extraídas de acordo com a metodologia desenvolvida para extração de proteínas do milho na Embrapa - Sete lagoas, MG, a partir da técnica descrita por Landry, modificada por Teixeira (Teixeira, 1995).

Algumas das sementes escolhidas fazem parte da dieta das crianças e outras como amendoim e soja foram escolhidas pelo seu poder alergênico. Essas sementes também foram escolhidas de acordo com a disponibilidade e facilidade de processamento das mesmas dando sequência ao trabalho realizado na dissertação de mestrado da própria pesquisadora com camundongos.

As sementes foram moídas em moedor de café elétrico (Braun ®). O material resultante foi passado em peneira fina de aço inoxidável e colocado em tubo de 50ml e suspenso em tampão de extração na proporção de 1/10 peso da semente moída / vol de tampão de extração (tampão borato ou salina fisiológica). Os tubos foram agitados delicadamente por inversão durante 3h, à temperatura ambiente. A seguir, o material foi centrifugado a 5°C e 3000 rpm durante 30 minutos. A camada superior, contendo gordura, foi desprezada da mesma forma

que o precipitado de semente. O sobrenadante intermediário foi recolhido, aliquotado e conservado a -20°C até o momento da utilização. A concentração de proteínas foi determinada pela técnica de Lowry (Lowry 1951).

4.3 Dosagem de proteína obtida nos extratos

4.3.1 Preparo dos reagentes

Reativo 1

Sulfato de cobre (CuSO_4) 1%	0
	,5 mL
Tartarato de sódio ($\text{C}_4\text{H}_2\text{Na}_2\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 2%	0
	,5 mL
Carbonato de sódio (NaCO_3) 2%.	5
	0 mL

Reativo de Folin -Diluição

Reativo de Folin	400 μL
H_2O destilada	6000 μL

4.3.2 Elaboração da curva padrão

A partir da amostra titulada de BSA (1mg/mL) foram feitas 4 diluições como indicado na tabela 1.

Tabela 1 - Diluição da solução padrão e fases da dosagem de proteína

os	Tub	Volu me (mL)	H_2O destilada (mL)	Reati vo 1* (mL)	Reativo de Folin (mL)
co	Bran	—	0,60	4	0,4
50 μg	BSA	0,05	0,55	4	0,4

100 μ g	BSA	0,10	0,50	4	0,4
200 μ g	BSA	0,20	0,40	4	0,4
300 μ g	BSA	0,30	0,30	4	0,4

Tabela 2 - Diluição dos extratos salino e borato

Tipo de extrato	Diluição
Extrato salino	Diluição 1:5
Extrato borato	Diluição 1:10

Cada amostra de extrato foi diluída como mostrado na Tabela 3 e o exemplo utilizado é para a semente de amendoim.

Uma vez que as amostras foram diluídas, acrescentamos o reativo 1 aos tubos e esperamos a reação por 10 minutos. O reativo de Folin-Ciocalteu foi diluído (de acordo com tabela 3) e acrescentado às amostras após os 10 minutos da reação anterior. Após esta última etapa, esperamos por mais 50 minutos para que as amostras obtivessem coloração proporcional ao seu conteúdo de proteína.

Tabela 3 - Diluição das amostras e fases da dosagem de proteína

Tubos	V olume (mL)	H ₂ O destilada (mL)	Re ativo (mL)	Reativ o de Folin (mL)
Amd borato 1	0 ,05	0,55	4	0,4
Amd borato 2	0 ,10	0,50	4	0,4
Amd borato 3	0 ,20	0,40	4	0,4
Amd salino 1	0 ,05	0,55	4	0,4

Amd	0	0,50	4	0,4
salino 2	,10			
Amd	0	0,40	4	0,4
salino 3	,20			

Após os 50 minutos de reação foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 500nm. Cada amostra foi lida duas (2) vezes e foi retirada a média das leituras de cada tubo. Estabelecemos a equação da reta e o valor de R^2 , a partir do qual foi calculada a concentração de proteína das amostras.

4.4 ELISA

Para a avaliação dos títulos de anticorpos IgG e IgE anti-proteínas dos soros dos pacientes foi utilizada a técnica de ELISA. E foi seguida a seguinte rotina:

Cobrir placas de poliuretano de microtitulação com 10 μ g da proteína em 100 μ l de tampão PBS por poço e incubar durante 12 -18 horas a 4°C;

Lavar duas vezes com uma solução de PBS-Tween 0,05% e cobrir com PBS-gelatina;

Incubar durante 1 hora, à temperatura ambiente;

Para a diluição seriada dos soros:

Esgotar o conteúdo das placas e acrescentar 100 μ l de PBS-gelatina a 10% em todos os poços;

Acrescentar 80 μ l de PBS-gelatina nos poços da primeira fileira, totalizando 180 μ l;

Adicionar 20 μ l de soro diluído a 1:10 na primeira fileira e, em seguida, realizar uma diluição seriada com fator 3 obtendo-se uma diluição final de 1:81900;

Incubar os soros a serem testados a temperatura ambiente por 3h;

Lavar as placas seis vezes com PBS-Tween 0,05%;

Adicionar 50 μ l/poço de anticorpo de cabra anti-cadeia pesada de IgG de humano, conjugado com peroxidase;

Incubar por mais 3h à temperatura ambiente;
Lavar seis vezes como na etapa anterior;
Adicionar 50µl/poço da solução do substrato (4mg de OPD, 8µl de H₂O₂ 20v em 10ml de tampão citrato fosfato);
Interromper após 20 minutos com uma solução 1N de H₂SO₄;
Medir as densidades ópticas em leitor de ELISA (Anthos 2010[®]), utilizando um comprimento de onda de 492nm;
A análise dos resultados foi realizada pela comparação da área abaixo de cada curva de diluição seriada denominada de ELISA*.

4.5 Estatística

Variáveis contínuas serão apresentadas por mediana. Utilizamos o teste t de *student*, a Análise de Variância ANOVA com o pós-teste de *Tukey* para a determinação da diferença mínima significativa.

Todos os testes estatísticos foram feitos com auxílio do software **GraphPadPrisma®** versão 5.01 *for Windows*, GraphPad Software, San Diego – Califórnia – USA, www.graphpad.com Copyright 1992-1998. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

Aspectos éticos: Este estudo foi aprovado pela CAPPesq sob número 0493/08.

RESULTADOS

5 Resultados

Serão apresentados a seguir os gráficos relacionados a reatividade dos isoipos IgG e IgE sendo identificados os valores significantes de $p < 0,05$.

5.1 Reatividade a proteínas de sementes

Figura 3 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgG específicos anti-amendoim (*Arachis hypogea*) de pacientes alérgicos a LV, tolerantes a LV e controles.

Comparando as concentrações séricas de IgG das crianças alérgicas ao leite de vaca dos grupos alérgico, tolerante e controle analisadas para a semente de amendoim, observa-se que o grupo controle apresenta diferença significativa

em relação aos outros dois grupos e o grupo alérgico mostra diferença significativa do grupo tolerante (figura 3).

Figura 4 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgE específicos anti-amendoim (*Arachis hypogea*) de pacientes alérgicos a LV, tolerantes a LV e controles.

Comparando as concentrações séricas de IgE das crianças alérgicas ao leite de vaca dos grupos alérgico, tolerante e controle analisadas para a semente de amendoim, observa-se que o grupo controle apresenta diferença significativa em relação ao grupo das crianças alérgicas ao leite de vaca e o grupo de crianças tolerantes. Apesar de apresentar concentrações de IgE específica mais elevadas o grupo alérgico não mostrou diferença significativa em relação ao grupo tolerante ($p=0,1511$) (figura 4).

Figura 5 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgG específicos anti-feijão fradinho (*Vigna unguiculata*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles

Comparando as concentrações séricas de IgG das crianças alérgicas ao leite de vaca dos grupos alérgico, tolerante e controle analisadas para o feijão fradinho, observa-se que o grupo controle apresenta diferença significativa em relação ao grupo das crianças tolerantes ao leite de vaca. O grupo alérgico apesar de apresentar concentrações séricas de IgG mais elevadas que o grupo controle não mostrou diferença significativa ($p=0,7842$) porém em relação ao grupo tolerante o grupo alérgico apresenta diferença significativa.

Figura 6 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgE específicos anti-feijão fradinho (*Vigna unguiculata*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles

Comparando as concentrações séricas de IgE das crianças alérgicas ao leite de vaca dos grupos alérgico, tolerante e controle analisadas para feijão fradinho, observa-se que o grupo controle apresenta diferença significativa para o grupo das crianças alérgicas ao leite de vaca e para o grupo de crianças tolerantes. O grupo alérgico não mostrou diferença significativa em relação ao grupo tolerante ($p=0,2311$) (figura 6).

Figura 7 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgG específicos anti-feijão roxinho (*Phaseolos vulgaris*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles.

A análise das concentrações de IgG para feijão roxinho não mostrou diferença significativa entre os três grupos: controle vs alérgico ($p=0,9147$); grupo controle vs grupo tolerante ($p=0,1306$) e não houve diferença significativa entre os grupos de crianças alérgicas e tolerantes ao leite de vaca ($p=0,1644$) (figura 7).

Figura 8 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgE específicos anti-feijão roxinho (*Phaseolus vulgaris*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles.

Comparando as concentrações séricas de IgE das crianças alérgicas ao leite de vaca dos grupos alérgico, tolerante e controle analisadas para feijão roxinho, observa-se diferença significativa entre o grupo controle e o grupo das crianças alérgicas ao leite de vaca. O grupo controle não apresentou resultado significativo em relação grupo tolerante ($p=0,0286$). O grupo alérgico também não foi significativo em relação ao grupo tolerante ($p=0,1024$) (figura 8).

Figura 9 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgG específicos anti-milho (*Zea mays*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles.

Comparando as concentrações séricas de IgG das crianças alérgicas ao leite de vaca dos grupos alérgico, tolerante e controle analisadas para o milho, observa-se que o grupo controle apresenta diferença significativa em relação ao grupo das crianças alérgicas ao leite de vaca. O grupo alérgico apresenta diferença significativa em relação ao grupo tolerante. Não houve diferença significativa do grupo tolerante em relação ao grupo controle ($p=0,3583$) (figura 9).

Figura 10 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgE específicos anti-milho (*Zea mays*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles.

Comparando as concentrações séricas de IgE das crianças alérgicas ao leite de vaca dos grupos alérgico, tolerante e controle analisadas para o milho, observa-se que o grupo controle apresenta diferença significativa em relação o grupo das crianças tolerantes ao leite de vaca. O grupo controle não apresentou resultado significativo em relação grupo alérgico ($p=0,0819$). O grupo alérgico também não foi significativo em relação ao grupo tolerante ($p=0,2414$) (figura 10).

Figura 11 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgG específicos anti-ervilha (*Pisum sativum*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles.

Comparando as concentrações séricas de IgG das crianças alérgicas ao leite de vaca dos grupos alérgico, tolerante e controle analisadas para a ervilha, observa-se que o grupo controle apresenta diferença significativa para o grupo das crianças tolerantes ao leite de vaca. O grupo alérgico apresenta diferença significativa em relação ao grupo tolerante. Não houve diferença significativa do grupo alérgico em relação ao grupo controle ($p=0,1378$) (figura 11).

Figura 12 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgE específicos anti-ervilha (*Pisum sativum*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles.

Comparando as concentrações séricas de IgE das crianças alérgicas ao leite de vaca dos grupos alérgico, tolerante e controle analisadas para ervilha, observa-se que o grupo controle apresenta diferença significativa para o grupo das crianças alérgicas ao leite de vaca em relação ao grupo de crianças tolerantes. O grupo alérgico não mostrou diferença significativa em relação ao grupo tolerante ($p=0,1701$) (figura 12).

Figura 13 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgG específicos anti-lentilha (*Lens esculenta*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles.

Comparando as concentrações séricas de IgG das crianças alérgicas ao leite de vaca dos grupos alérgico, tolerante e controle analisadas para lentilha, observa-se que o grupo controle apresenta diferença significativa em relação ao grupo das crianças alérgicas ao leite de vaca e para o grupo de crianças tolerantes. O grupo alérgico não mostrou diferença significativa em relação ao grupo tolerante ($p=0,6401$) (figura 13).

Figura 14 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgE específicos anti-lentilha (*Lens esculenta*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles.

Comparando as concentrações séricas de IgE das crianças alérgicas ao leite de vaca dos grupos alérgico, tolerante e controle analisadas para lentilha, observa-se que o grupo controle apresenta diferença significativa em relação ao grupo das crianças alérgicas ao leite de vaca. O grupo controle não apresentou resultado significativo em relação grupo tolerante ($p=0,0823$). O grupo alérgico também não foi significativo em relação ao grupo tolerante ($p=0,1650$) (figura 14).

Figura 15 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgG específicos anti-soja (*Glycine max*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles.

A análise das concentrações de IgG para soja não mostrou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo alérgico ($p=0,6053$); entre o grupo controle e o grupo tolerante ($p=0,8312$) e não houve diferença significativa entre os grupos de crianças alérgicas e tolerantes ao leite de vaca ($p=0,5761$) (figura 15).

Figura 16 - Comparação da distribuição das concentrações séricas de anticorpos IgE específicos soja (*Glycine max*) de pacientes alérgicos ao LV, tolerantes ao LV e controles.

Nos grupos analisados para concentrações séricas de IgE anti-soja observa-se diferença significativa entre os grupos alérgico e tolerante em relação ao grupo controle. Porém não houve diferença significativa entre os grupos de crianças alérgicas e tolerantes ao leite de vaca ($p=0,2384$) (figura 16).

Na tentativa de se demonstrar a homogeneidade em cada grupo optamos por incluir os dados de dispersão das concentrações dos isotipos IgG e IgE de cada semente analisada em cada grupo de crianças (figuras 17-22)

Figura 17 - Dispersão da concentração dos soros dos pacientes alérgicos para as sete sementes analisadas para reatividade a IgG

No gráfico acima observa-se que a dispersão entre os pacientes do grupo de crianças alérgicas ao leite de vaca quando analisadas para IgG específica para as sete sementes, mostrando maior dispersão entre as concentrações de IgG séricas para soja (figura 17).

Figura 18 - Dispersão da concentração dos soros dos pacientes tolerantes para as sete sementes analisadas para reatividade a IgG

A dispersão em relação aos pacientes do grupo tolerante apresenta padrão semelhante em todas as sementes analisadas, no entanto o grupo analisado para soja mostra indivíduos com maior dispersão (figura 18).

Figura 19 - Dispersão da concentração dos soros dos pacientes controles para as sete sementes analisadas para reatividade a IgG

Quando analisada a dispersão dos pacientes do grupo controle para as sete sementes o mesmo padrão de dispersão de reatividade para a soja é observada neste grupo (figura 19).

Figura 20 - Dispersão da concentração dos soros dos pacientes alérgicos para as sete sementes analisadas para reatividade a IgE

As concentrações séricas de IgE mostrou que no grupo alérgico houve uma centralização dos valores em altas concentrações de IgE específica com maiores concentrações para a soja (figura 20).

Figura 21 - Dispersão da concentração dos soros dos pacientes tolerantes para as sete sementes analisadas para reatividade a IgE

As concentrações séricas de IgE mostraram que no grupo tolerante houve uma centralização dos valores em altas concentrações de IgE específica com maiores elevações para a soja. Padrão semelhante ao grupo alérgico (figura 21).

Figura 22 - Dispersão da concentração dos soros dos pacientes controles para as sete sementes analisadas para reatividade a IgE

Em relação às concentrações de IgE no grupo controle não se observou o mesmo tipo de padrão de reatividade visto para o isotipo IgG, pois nos grupos alérgicos e tolerantes houve uma centralização maior em altas concentrações de IgE específica no grupo soja, enquanto no controle essa centralização se deu em baixas concentrações (figura 22).

Figura 23 – Média das concentrações de IgG entre os pacientes alérgicos e tolerantes em relação ao grupo controle – soja

Para melhor elucidar os achados em relação à semente de soja observa-se no gráfico acima uma distribuição dos pacientes do grupo alérgico e tolerante em relação a média das concentrações de IgG sérica do grupo controle (figura 23).

DISCUSSÃO

6 Discussão

A alergia alimentar é uma reação adversa cujo mecanismo fisiopatológico envolve o sistema imune. Apesar de recebermos altas cargas de proteínas alergênicas na dieta diária, apenas poucos alimentos são capazes de desencadear alergia alimentar. Entre todos os alimentos que têm sido associados à AA na faixa etária pediátrica, o leite de vaca é o mais importante, tanto pela alergenicidade de suas proteínas, como pelo fato de ser o primeiro alimento oferecido à criança, assim que ocorre o desmame. Dependendo da época do desmame, além do início de uma alimentação com proteínas desconhecidas até então pelo lactente, pode ocorrer concomitantemente uma imaturidade da barreira intestinal, permitindo a passagem de proteínas da dieta, incluindo aquelas do leite de vaca, com alto potencial alergênico (Heyman, 2005).

Um estudo de base populacional, utilizando um questionário da Food and Drugs Administration (FDA) dos EUA estimou a prevalência de 9,1% de auto relatos de alergia alimentar em adultos e 5,3% com um diagnóstico de alergia feito por um médico. Enquanto em alguns estudos, onde se avaliaram os casos que compareciam a setores de emergência hospitalar, alergia a frutos do mar tem sido descrita como a quarta etiologia mais alergênica envolvida na hipersensibilidade alimentar em pacientes acima de 6 anos de idade, outra meta-análise observou que o leite, ovo, amendoim e nozes eram mais comuns na população geral (Kandar *et al*, 2010).

A alergia ao leite de vaca é a AA mais prevalente em crianças, atingindo cerca de 2 a 3% das crianças nos primeiros 3 anos de vida (Hill e Hosking, 1996; Isolauri, 1997; Høst *et al*, 2002; Heine *et al*, 2002). Na literatura, existe grande variabilidade quanto à prevalência da ALV, provavelmente pela diversidade de métodos diagnósticos, com poucos estudos utilizando o teste duplo cego placebo controlado (TDCPC), considerado padrão ouro para o diagnóstico de ALV.

O espectro clínico da ALV é bastante amplo e engloba sinais e sintomas inespecíficos, que podem levar a confusão com outras reações adversas aos alimentos. As manifestações clínicas da ALV variam tanto no tipo do órgão atingido como em gravidade, podendo se manifestar desde um quadro clínico de dermatite como uma anafilaxia, com risco de óbito (Sampson, 1999; Sampson, 2003).

Os mecanismos imunológicos envolvidos nas manifestações clínicas dos pacientes com ALV incluem tanto o mecanismo IgE mediado como aquele não IgE mediado, em especial nos quadros com manifestações gastrintestinais (Bischoff e Crowe, 2004; Heine *et al*, 2004). Frequentemente se observa a associação de ambos mecanismos, tais como nas manifestações eosinofílicas do trato gastrintestinal. Essas doenças são caracterizadas por infiltração do trato gastrintestinal com eosinófilos, na ausência de outras células inflamatórias (Sicherer, 2005; Eigenmann *et al*, 2008).

A alergia ao leite de vaca é geralmente transitória e cerca de 80% das crianças desenvolvem tolerância ao leite de vaca, próximo à idade de 3 anos (Bishop *et al*, 1990; Sampson *et al*, 1992; James e Sampson, 1992; Hill *et al*, 1993;

A alergia ao leite de vaca tem mudado seu perfil evolutivo nas últimas décadas, sendo responsável por muitos pacientes que se mantêm alérgicos até a adolescência (Skripak *et al*, 2007; Ben Halima *et al*, 2003). Vários fatores têm sido apontados como possíveis na evolução para persistência, tais como a presença de anafilaxia, sensibilização à caseína e mesmo múltiplas alergias alimentares (Vanto *et al*, 2004, Jacob, 2008).

Muitos pacientes com ALV apresentam múltiplas alergias alimentares, incluindo aqueles alimentos de suas dietas diárias. A causa desta multiplicidade de desencadeantes pode ser o excesso da carga protéica ingerida ou uma alteração da permeabilidade intestinal não detectada pela ausência de sintomatologia clínica relacionada ao trato gastrintestinal.

A permeabilidade da mucosa intestinal é consequente à integridade do trato gastrintestinal e da persistência de processos inflamatórios que podem estar

associados à doença inflamatória intestinal e alergias alimentares. Atualmente, com o conhecimento do papel da interleucina 9 no processo inflamatório da mucosa intestinal mediada por linfócitos TH2, estimulando a produção de interleucina 4 e conseqüentemente a síntese de IgE, pode-se começar a entender os mecanismos envolvidos na relação entre alergia alimentar e alterações da permeabilidade intestinal (Forbes et al, 2008).

Embora de grande interesse, quando pesquisado no pubmed com as palavras de busca *cow's milk allergy and intestinal permeability* é possível obter apenas 34 registros, sendo que nem todos os artigos citados são dirigidos apenas a este tema.

Se a hipótese de que pacientes com ALV podem apresentar alterações de permeabilidade intestinal for real, é possível que o processo se inicie com a reatividade de isotipos IgE e também IgG às proteínas da dieta destes pacientes.

A reatividade a múltiplas proteínas da dieta foi pouco avaliada em pacientes com ALV IgE mediada por se entender até recentemente, que este fenômeno se tratava de reações normais a estas proteínas, expressando apenas a sensibilização a alimentos da dieta, sem o aparecimento de alergia alimentar a estes alimentos. Johansson e colaboradores em 1984 já comentavam que a presença de IgG específica aos alimentos poderia ser considerada normal, mas talvez, não um fenômeno fisiológico.

Estudo de Hochwallner e colaboradores em 2011 avaliou subclasses de IgG e anticorpos IgA específicos a alimentos em pacientes com intolerância não IgE mediada, comparando estes a um grupo controle e não achou diferenças em relação à detecção de anticorpos IgA e IgG para leite nos dois grupos.

Reações alérgicas tardias a alimentos têm sido atribuídas à presença de IgG, IgA e IgM específicas, podendo demorar até vários dias para seu aparecimento (Vojdani et al, 2009). Por esta razão, anticorpos séricos de qualquer classe de imunoglobulina para alérgenos alimentares têm sido associados à alergia alimentar.

No estudo aqui apresentado, foram avaliados anticorpos IgE e IgG para proteínas alimentares da dieta, presentes no soro de crianças com ALV

persistentes, pacientes tolerantes ao LV e grupo controle. Observou-se, com alguns alérgenos, concentrações elevadas de IgE e IgG nos grupos alérgicos e tolerantes, em relação ao grupo controle. A interpretação destes resultados deve ser cautelosa, mas uma possibilidade é que ambos os grupos com altas concentrações de isotipos específicos, em especial o alérgico, sejam aqueles com alterações de permeabilidade intestinal, que estimularam uma resposta mais potente destes anticorpos a proteínas da dieta. Outra hipótese é que este fenômeno realmente faça parte da fisiopatologia da alergia alimentar, não reconhecida até o momento, onde parte da resposta imune de mucosas levasse à produção de IgE e outra parte, com menor significado clínico aparente, à produção de IgG às mesmas proteínas alimentares. A diferença significativa entre os grupos controle e alérgico em relação à presença do anticorpo IgG não foi observada com todas as sementes testadas, mas sim para amendoim, milho, ervilha e lentilha. Isto poderia ser explicado pela possibilidade, que mesmo crianças com ALV por mecanismo IgE mediado poderiam ter alterações da mucosa intestinal, facilitando a passagem de algumas proteínas alimentares pela barreira epitelial do trato gastrointestinal. Esta possibilidade nunca foi pesquisada nestas crianças, pela ausência de repercussões clínicas relacionadas a este achado.

Um dado interessante, foi a observação das elevadas concentrações de IgE específica para soja dos grupos alérgicos e tolerantes em relação ao grupo ao grupo controle. Isto eventualmente pode ser explicado pela substituição do leite de vaca pela soja em muitos pacientes aqui incluídos, até o desenvolvimento da tolerância. A favor deste argumento é a observação de que o grupo tolerante também apresenta altas concentrações de IgE específica para soja. Outro dado interessante da soja é a constatação da grande dispersão dos pacientes, quando analisadas as concentrações de IgG nos grupos alérgico e tolerante. Em relação às concentrações de IgE não se observou semelhante fato, pois nos grupos alérgicos e tolerantes houve uma centralização dos valores em altas concentrações de IgE específica, enquanto no controle esta centralização ocorreu em baixas concentrações. Estas observações podem ter sido consequentes às

características intrínsecas da soja, em especial sua estabilidade aos processos digestivos.

Em uma simulação de um ensaio utilizando líquido gástrico *in vitro* para avaliar a digestibilidade de determinadas sementes após a cocção, Misra e colaboradores mostraram que proteínas alergênicas purificadas foram estáveis para digestão. No mesmo experimento, os autores observaram o contrário para a digestão de proteínas consideradas não-alérgênicas, mesmo após a cocção. Em relação aos extratos de proteínas da soja, amendoim, grão de bico e feijão foi realizada a digestão *in vitro* para detectar suas partes não digeríveis. Seis proteínas de soja e sete do amendoim mostraram-se intactas após a experiência. Da mesma forma, sete proteínas de grão de bico com os respectivos peso molecular (70, 64, 55, 45, 35, 20 e 18 kDa) e cinco de feijão (45, 29, 24, 20 e 6,5 kDa) mantiveram-se sem digestão adequada. A maioria das proteínas estáveis *in vitro* por mais de 2 minutos mostrou similaridade com alérgenos caracterizados com base em seus pesos moleculares, como no caso da soja, amendoim, grão de bico e feijão. Além disso, proteínas estáveis da soja e grão de bico mostraram propriedades de ligação com IgE de soro de paciente alérgico as respectivas sementes (Misra *et al* 2009).

Na alergia alimentar intestinal, a não especificidade dos sintomas gastrintestinais e do acesso ao órgão são as razões para o limitado entendimento da fisiopatologia desta doença e as dificuldades no estabelecimento de um diagnóstico apropriado para o paciente em relação ao trato gastrintestinal (Pizzuti *et al*, 2011). Essas dificuldades podem nos fazer pensar em soluções para a clínica com relação a novos estudos das possíveis alterações gastrintestinais na alergia ao leite de vaca IgE mediada.

O sistema gastrintestinal desempenha um papel central na homeostase do sistema imunológico. É a principal via de contato com o ambiente externo e é sobrecarregado a cada dia com estímulos externos, às vezes perigosos como patógenos (bactérias, protozoários, fungos, vírus) ou substâncias tóxicas, em outros casos muito útil como os alimentos da dieta e até mesmo a microbiota. A posição fundamental do sistema gastrintestinal pode ser visto quando observa-se

a grande quantidade de células imunológicas que fazem parte deste sistema. De fato, o tecido linfóide associado a mucosa gastrointestinal (GALT) representa quase 70% de todo o sistema imunológico, além disso, cerca de 80% células plasmáticas, principalmente células secretoras de imunoglobulina A (IgA), residem no GALT. Este sistema interage com a microbiota intestinal e interfere em várias funções gastrintestinais de forma dinâmica, tal como o fenômeno de tolerância a proteínas alimentares e a degradação de alérgenos alimentares. Os mecanismos imunológicos envolvidos nessas ações são muito complexos e pertencem tanto à imunidade inata como adaptativa. Os resultados de suas interações dependem de diferentes contextos em que o contato com agentes externos ocorre e pode mudar de acordo com diferentes configurações genéticas dos indivíduos (Vighi *et al*, 2008).

Pizzuti e colaboradores em 2011 relataram que no tecido do intestino delgado de pacientes com reações alérgicas após a provocação oral com alérgenos alimentares há uma perda nos resultados de imunofluorescência e uma distribuição de sinais alterados de proteínas das *tight junctions* no epitélio intestinal, sugerindo uma interrupção deste complexo, de forma consistente com alteração da função da barreira funcional, descrito em pacientes alérgicos. Estes autores sugerem que o aumento da permeabilidade intestinal pode desempenhar um papel importante na alergia alimentar, porque expõe a mucosa a antígenos de origem alimentar e bacteriana. Na verdade, o aumento da permeabilidade epitelial foi mais a consequência, e não a causa, de sensibilização alimentar, embora participe de um ciclo vicioso que mantém a inflamação alérgica.

Aumento da permeabilidade intestinal é uma causa provável de diversas patologias, como alergias e doenças inflamatórias gastrintestinais. As alterações na permeabilidade intestinal são encontradas em muitas situações clínicas graves e em doenças comuns como a Síndrome do Intestino Irritável. Nessas condições, substâncias que normalmente são incapazes de atravessar a barreira epitelial ganham acesso à circulação sistêmica. O aumento da permeabilidade intestinal deve ser amplamente melhorada através da adição na dieta de compostos, tais como glutamina ou a curcumina, ambos com potencial para inibir a inflamação e o

estresse oxidativo ligado à abertura das *tight junctions* (Rapin e Wiernsperger, 2010).

A via paracelular entre células epiteliais intestinais tornou-se importante para nossa compreensão do trato gastrointestinal e de doenças sistêmicas. Na verdade, a passagem de material luminal não é uma barreira estática. Esta é reconhecida como uma estrutura dinâmica em constante mudança funcional, que é cuidadosamente regulado. Microrganismos que vivem no lúmen são capazes de modular o estado das *tight junctions* através de mecanismos múltiplos, que podem gerar benefício para a microbiota, muitas vezes sendo deletérios para o hospedeiro. Uma função anormal desta via também pode ser observada em condições de doença que cursam com processos inflamatórios (Arrieta *et al*, 2006).

Em um estudo epidemiológico com 118 crianças com alergia alimentar, foi demonstrado que aquelas que tinham alergia alimentar mediada por IgE eram as mais suscetíveis a apresentar outras doenças alérgicas e ainda apresentavam maior predisposição a sensibilização a outras proteínas da dieta na fase escolar (Kusunoki *et al*, 2009). Assim a presença de uma doença alérgica aumenta o risco de se desenvolver outras alergias e sintomas que afetam diferentes órgãos (Simpson, 2008). Deve ser lembrado que a alergia alimentar é uma das primeiras doenças da marcha alérgica e seu controle poderia representar um ganho para os pacientes em relação à evolução para as outras doenças alérgicas que compõem esta marcha sequencial.

A reatividade cruzada entre as sementes não foi avaliada no estudo aqui descrito, uma vez que para isto seria necessário realizar testes de inibição da reatividade que demandam quantidades relativamente grandes de soro. É possível que a reatividade cruzada entre as leguminosas possa explicar os achados aqui encontrados como, por exemplo, entre a soja e os feijões. Além disso, a manutenção da integridade dessas sementes mesmo após a cocção talvez possa explicar a frequência de reatividade a várias sementes observadas neste estudo.

A utilização do teste de ELISA neste estudo se justifica pela acessibilidade e padronização da técnica, com excelente rendimento. Em estudo para validar o

teste de ELISA em 160 diferentes proteínas alimentares Volpi e Maccari mostraram ser este teste altamente sensível e específico para reprodução analítica da presença de anticorpos séricos tanto em animais como em seres humanos. Os testes foram realizados com os isotipos IgG e IgE para as diferentes proteínas em 6879 indivíduos da população italiana, sendo detectados altos títulos naqueles exames relacionados a leite de vaca e derivados. Um de seus achados mostrou que o aumento das concentrações de IgG, especialmente para o leite e clara de ovo, mas também para outros alimentos, era indicativo de risco aumentado para outras alergias IgE mediadas (Volpi *et al*, 2010).

Resultados de trabalhos experimentais com camundongos mostram que a resposta imunológica ao amendoim e a castanha de caju (uma oleaginosa não classificada entre os principais alérgenos alimentares) é semelhante. Ou seja, tanto é possível induzir a tolerância oral ou a imunização sistêmica dependendo das condições do organismo e da via de entrada do antígeno no organismo. Neste experimento houve pouca reatividade cruzada entre estas duas sementes, demonstrado pelo fato de que animais que comiam uma das duas sementes e eram imunizados com o extrato protéico da segunda, apresentaram tolerância a uma proteína e não à outra (Paschoal *et al*, 2009).

Os resultados obtidos neste estudo podem sugerir que o trato gastrointestinal de crianças com ALV IgE mediada podem apresentar alterações da mucosa intestinal que tem como consequência o aumento da permeabilidade intestinal, possibilitando a passagem de proteínas alimentares até a circulação sistêmica. Os estudos de reatividade a isotipos IgG e IgE poderiam ser utilizados para definir crianças de risco para múltiplas alergias alimentares. Um passo importante para interpretação destes achados seria a definição de pontos de corte destas concentrações na população normal, para posteriormente identificar as crianças de risco para outras alergias alimentares. Se este achado em relação ao isotipo IgG tem um papel na fisiopatologia da alergia alimentar tardia, ainda permanece a ser esclarecido.

Este estudo nos incentiva a estudar o trato gastrointestinal quanto à sua integridade e permeabilidade nas crianças com alergia alimentar imediata sem

sintomas gastrintestinais, oferecendo uma nova perspectiva de pesquisa para estudo da alergia alimentar.

CONCLUSÃO

7 Conclusão

A partir dos dados aqui apresentados nossas conclusões preliminares são:

Crianças alérgicas ao leite de vaca apresentam múltiplas reatividades as sete sementes analisadas para o isotipo IgG.

Crianças alérgicas ao leite de vaca apresentam múltiplas reatividades as sete sementes analisadas para o isotipo IgE.

A comparação entre os diversos grupos avaliados mostra que pacientes com alergia ao leite de vaca atual e os tolerantes a este alimento apresentam concentrações mais elevadas de IgG e IgE a outros alimentos que as crianças do grupo controle, o que pode ser possível devido a alteração de permeabilidade da mucosa intestinal nestes grupos.

BIBLIOGRAFIA

8 Bibliografia

Ahrens B, Beyer K, Wahn U, Niggemann B. Differential diagnosis of food-induced symptoms. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2008; 19: 92-6.

Allen KJ, Hill DJ, Heine RG. Food allergy in childhood. *Med J Aust*. 2006 Oct 2;185(7):394-400.

Arrieta MC, Bistriz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 2006;55:1512–20.

Avila C.L., Hidalgo C.E.M., Del Rio N.B.E. and Sienra M.J.J. "Cow-Milk's Protein Allergy." *Rev Alerg Mex* 2005; 52: 206-12.

Axan R; Drevin H; Kober A; Yman L. A new laboratory diagnostic system applied to allergy testing. *New England and Regional Allergy Proceedings*; 1988; 9(4):503.

Ben Halima N, Krichen A, Mekki MA, Ben ML, Chabchoub I, Chaabouni M, Triki A, Karray A. Persistent forms of cow's milk allergy. Report of 6 cases. *Tunis Med*. 2003; 81(9):731-7.

Bentz S., Hausmann M., Piberger H., Kellermeier S., Paul S., Held L., Falk W., Obermeier F., Fried M., Schölmerich J., Rogler G. "Clinical Relevance of IgG Antibodies against Food Antigens in Crohn's Disease: A Double-Blind". *Digestion* 2010;81:252–64.

Bishop JM, Hill DJ, Hosking CS. Natural history of cow milk allergy: clinical outcome. *J Pediat*. 1990; 116:862–7.

Bischoff S, Crowe SE. Food allergy and the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol*. 2004; 20:156-61.

Björkstén B. Genetic and environmental risk factors for the development of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005; Jun;5(3):249-53.

Boyce J et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Report of the NIAID-Sponsored Expert Panel. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126:S1-S58.

Caffarelli C, Baldi F, Bendandi B, Calzone L, Marani M, Pasquinelli P. Cow's milk protein allergy in children: a practical guide. *Italian Journal of Pediatrics*. 2010; 36:5.

Chapman JA, Bernstein IL, Lee RE, Oppenheimer J, Nicklas RA, Portnoy JM, Sicherer SH. Food allergy: a practice parameter. *Annals of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2006; 96(3) Supplement 2:S1-S68.

Crespo JF, James JM, Fernandez-Rodriguez C, Rodriguez J. Food allergy: nuts and tree nuts. 2006; *Br J Nutr*. Nov;96 Suppl 2:S95-102.

Dreborg S, Frew A . Allergen standardisation and skin tests. *Allergy* 1993;47-8.

Drisko J, Bischoff B, Hall M, McCallum R. Treating irritable bowel syndrome with a food elimination diet followed by food challenge and probiotics. *J Am Coll Nutr*. 2006 Dec;25(6):514-22.

Eigenmann PA, Beyer K, Burks AW, Lack G, Liacouras CA, Hourihane JO'B, Sampson HA, Sodergren E. New visions for food allergy. An iPAC summary and future trends. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19 (suppl 19):26-39.

Eigenmann PA. "Mechanisms of food allergy." *Pediatr Allergy Immunol* 2009; 20: 5–11.

Forbes EE, Groschwitz Ke, Abonia JP, Brandt EB, Cohen E, Blanchard C, Ahrens R, Seidu L, McKenzie A, Strait R, Finkelman FD, Foster PS, Matthaei KI, Rothenberg ME, Hogan SP. IL-9 – and mast cell – mediated intestinal permeability predisposes to oral antigen hypersensitivity. *The Journal of experimental Medicine*. 2008, V.205, (4),897-913.

Garside P, Millington O, Smith KM. The anatomy of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; Dec;1029:9-15.

Heine RG, Elsayed S, Clifford S, Hill DJ. Cow's milk allergy in infancy. *Curr Allergy Clin Immunol* 2002; 2:217-25.

Heine RG. Pathophysiology, diagnosis and treatment of food protein-induced gastrointestinal diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004; 4:221-29.

Herman EM, Helm RM, Jung R, Kinney AJ. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol*. 2003; May;132(1):36-43

Heyman M. Gut barrier dysfunction in food allergy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:1279-85.

Hill DJ, Firer MA, Ball G, Hosking CS. Natural history of cow's milk allergy in children: Immunological outcome over 2 years. *Clin Exp Allergy* 1993; 23:124-31.

Hill DJ, Hosking CS. Cow's milk allergy in infancy and early childhood. *Clin Exp Allergy* 1996;26:243-6.

Hochwallner H, Schulmeister S, Swoboda I, Twaroch TE, Vogelsang H, Kasemi-Shirazi L, Kundi M, Balic N, Quirce S, Rumpold H, Fröschl R, Horak F, Tichatschek B, Stefanescu CL, Szépfalusi Z, Papadopoulos NG, Mari A, Ebner C, Pauli G, Valenta R, Spitzauer S. Patients suffering from non-IgE-mediated cow's milk protein intolerance cannot be diagnosed based on IgG subclass or IgA responses to milk allergens. *Allergy*; 2011; 66: 1201-07.

Hodge L; Swain A; Faulkner-Hogg K. Food allergy and intolerance. *Australian Family Physician*, 2009;Vol.38(9).

Holloway E, Fox A, Fitzsimons R. Diagnosing and managing food allergy in children. *Practitioner*. 2011 Jun;255(1741):19-22.

Hong X, Tsai HJ, Wang X. Genetics of food allergy. *Curr Opin Pediatr*. 2009 Dec;21(6):770-6.

Høst A, Halken S, Jacobsen HP, Christensen AE, Herskind AM, Plesner K: Clinical course of cow's milk protein allergy/ intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 2002;13 (Supp 15): 23–8.

Isolauro E: Cow's milk allergy. *Environ Toxicol Pharmacol* 1997;4:137–41.

Jacob CMA. Fatores prognósticos associados à persistência da alergia alimentar ao leite de vaca [tese livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, universidade de São Paulo; 2008.

James J, Sampson HA. Immunologic changes associated with the development of tolerance in children with cow's milk allergy. *J Pediatr* 1992; 121:371-7.

Johansson SG, Dannaesus A, Lilja G. The relevance of anti-food antibodies for the diagnosis of food allergy. *Ann Allergy*; 1984 Dec;53(6):665-72.

Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J et al A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001; 56:813–24. **(Figura 1).**

Kamdar T, Bryce PJ. Immunotherapy in food allergy. *Immunotherapy*. 2010 May;2(3):329-38.

Kim J. S. Food allergy: diagnosis, treatment, prognosis, and prevention. *Pediatr Ann*. 2008; 37: 546-51.

Kusunoki T., Morimoto T., Nishikomori R., Heike T., Fujii T., Nakahata T. "Allergic status of schoolchildren with food allergy to eggs, milk or wheat in infancy." *Pediatr Allergy Immunol* 2009; 20: 642–7.

Miller A., Lider O., Abramsky O. and Weiner, H.L. "Orally Administered Myelin Basic Protein in Neonates Primes for Immune Responses and Enhances Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Adult Animals." *Eur J Immunol* 1994; 24: 1026-32.

Misra A, Prasad R, Das M, Dwivedi PD. Probing novel allergenic proteins of commonly consumed legumes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2009; Jun;31(2):186-94.

Murch S.H. "The Immunologic Basis for Intestinal Food Allergy." *Curr Opin Gastroenterol* 2000; 16: 552-7.

Niggemann B.; Beyer, K. Pitfalls in double-blind, placebo controlled oral food challenges. *Allergy*, 2007;62:729-32.

Nowak-Węgrzyn A. Adverse reactions to foods. *Med clin North Am*. 2006;90(1):97-127.

Paajanen L.; Korpela R.; Tuure T.; Honkanen J.; Järvelä I.; Ilonen J.; Knip M.; Vaarala O.; Kokkonen J. Cow milk is not responsible for most gastrointestinal

immune-like syndromes-evidences from a population-based study. The American Journal of Clinical Nutrition 2005; 82: 1327-35.

Paschoal PO; Campos SMN; Pedruzzi MMB; Garrido V; Bisso M; Antunes DMF; Nobrega AF; Teixeira G. Food allergy/hypersensitivity: Antigenicity or timing? Immunobiology, 2009; 214: 269–78.

Pelto L., Impivaara O., Salminen S., Poussa T., Seppanen R. and Lilius E.M. Milk Hypersensitivity in Young Adults. Eur J Clin Nutr 1999; 53: 620-4.

Pizzuti D, Senzolo M, Buda A, Chiarelli S, Giacomelli L, Mazzon E, Curioni A, Faggian D, De Lazzari F. In vitro model for IgE mediated food allergy. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2011; 46: 177–87.

Pourpak Z., Farhoudi A., Mahmoudi M., Movahedi M., Ghargozlou M., Kazemnejad A. and Eslamnoor B. "The Role of Cow Milk Allergy in Increasing the Severity of Atopic Dermatitis." Immunol Invest. 2004; 33: 69-79.

Prescott Susan L.; Martino David; Hodder Megan; Richman Tara; Tulic Meri K. "Progress in Understanding Postnatal Immune Dysregulation in Allergic Disease". World Allergy Organization Journal 2010; 3(4):162-6.

Rapin JR, Wiernsperger N. Possible links between intestinal permeability and food processing: a potential therapeutic niche for glutamine. Clinics 2010;65(6):635-43.

Reisacher W, Damask C, Calhoun K, Veling M. Food Allergy: State of the Science--Allergy, Asthma and Immunology Committee. Otolaryngol Head Neck Surg. 2011 Jul 19.

Sampson HA, Mendelson LM, Rosen JP: Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. N Engl J Med 1992;327:380-4.

Sampson H.A. "Immunopathogenesis and Clinical Disorders." J Allergy Clin Immunol 1999; 103: 717-28.

Sampson HA. Food allergy. J Allergy Clin Immunol. 2003; 111:S540-7.

Sastre J. Molecular diagnosis in allergy. Clin Exp Allergy. 2010 Oct;40(10):1442-60.

Skripak JM, Nash SD, Rowley H, Brereton NH, Oh S, Hamilton RG, Matsui EC, Burks AW, Wood RA. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of

milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. J Allergy Clin Immunol. 2008 Dec;122(6):1154-60.

Sicherer SH. Food protein-induced enterocolitis syndrome: cases presentation and management lessons. J Allergy Clin Immunol 2005; 115: 149-156

Sicherer S.H.; Wood R.A.; Stablein D. et al .Immunologic features of infants with milk or egg allergy enrolled in an observational study (Consortium of Food Allergy Research) of food allergy. J Allergy Clin Immunol, 2010; 125:1077-83.

Simpson C.R., Newton J., Hippisley-Cox Sheikh, A. "Incidence and prevalence of multiple allergic disorders recorded in a national primary care database". J R Soc Med 2008; 101: 558-63.

Solé D, Silva LR, Rosário Filho NA, Sarni ROS et al. Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: Documento conjunto elaborado pela Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia. Rev. bras. alerg. imunopatol. 2008; V31, Nº 2:64-86.

Sporik R.; Hill DJ.; Hosking CS. Specificity of allergen skin testing in predicting positive open food challenges to milk, egg and peanut in children. Clin Exp Allergy. 2008; 30:1540-6.

Skripak JM, Matsui EC, Mudd K, Wood RA. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. J Allergy Clin immunol. 2007; 120(5):1172-7.

Vanto T, Helppilä S, Juntunen-Backman K, Kalimo K, Klemola T, Korpela R, Koskinen P. Prediction of the development of tolerance to milk in children with cow's milk hypersensitivity. J Pediatr. 2004; 144:218-22.

Vighi G, Marcucci F, Sensi L, Di Cara G, Frati F. Allergy and the gastrointestinal system. Clinical and Experimental Immunology, 153 (Suppl. 1): 3–6.

Vojdani A. Detection of IgE, IgG, IgA and IgM antibodies against raw and processed food antigens. Nutr Metab (Lond). 2009 May 12;6:22.

Volpi N.; Maccari F. "Serum IgG Responses to Food Antigens in the Italian Population Evaluated by Highly Sensitive and Specific ELISA Test". Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 2009; 30: 51–69.

Wang J, Sampson HA. Food anaphylaxis. Clin Exp Allergy. 2007 May;37(5):651-60.

Williams LM.; Bock SA. Skin testing and food challenges in allergy and immunology practice. Clin Rev Allergy Immunol. 1999; 17:323-38.

Zeiger R.S. Food Allergen Avoidance in the Prevention of Food Allergy in Infants and Children. Pediatrics, 2003;111;1662-71.