CLAUDIA PLECH GARCIA BARBOSA

**Tolerância ao leite processado em altas temperaturas
em pacientes com alergia ao leite de vaca mediada
pela imunoglobulina E**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Pastorino

**São Paulo
2015**

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barbosa, Claudia Plech Garcia

Tolerância ao leite processado em altas temperaturas em pacientes com alergia ao leite de vaca mediada pela imunoglobulina E / Claudia Plech Garcia Barbosa. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Pediatria.

Orientador: Antonio Carlos Pastorino.

Descritores: 1.Hipersensibilidade alimentar 2.Hipersensibilidade a leite
3.Hipersensibilidade a leite/diagnóstico 4.Hipersensibilidade a leite/terapia
5.Hipersensibilidade a leite/dietoterapia 6.Imunoterapia 7.Tolerância imunológica
8.Dessensibilização imunológica

USP/FM/DBD-499/15

*Dissertação dedicada à Professora Dra Cristina
Miuki Abe Jacob, por me ensinar sobre a sabedoria de ser
uma incansável aprendiz, me contagiando com o desafio da arte
do ensinar. Este trabalho foi um sonho que sonhamos juntas.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por tornar o impossível possível.

A Isabel, meu verdadeiro tesouro, por ser o motivo pelo qual farei deste mundo um local melhor para vivermos, por encher meu coração de amor e esperança.

A Fellipe, pelo companheirismo de todos os momentos, apoio incondicional, incentivo diário, uma joia rara, que quero cuidar com todo meu amor.

Aos meus pais, Carmen e Claudio, por serem os maiores exemplos de seres humanos que conheço na vida, admiráveis pela disposição em ajudar o próximo, e por me deixarem as maiores das heranças: o prazer pelo estudo e pelo trabalho honesto.

Aos meus avós, Leonilda e Manoel, por serem um pedaço de céu na cidade da garoa, um paraíso sempre disposto a me acolher.

À minha avó Carminha, pelas orações de uma vida inteira, e ao meu avô Roberto, pelas lembranças que me acariciam a alma.

Aos meus sogros, Helia e Ricardo, por me receberem em sua família como a uma filha amada, pela ajuda sempre que precisei.

A Hercules por ser feito de amor, início do nosso lar.

Aos professores, sem os quais este trabalho não seria uma realidade: Dr Antonio Carlos Pastorino, que me acolheu e me guiou como um mestre, sempre disposto a ajudar; e Dra Ana Paula Moschione, que compartilha seus nobres conhecimentos, sempre com uma mão amiga estendida.

À equipe de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança, em especial Andrea Gushken, Cleonir Beck, Cristiane de Jesus e Mayra Dorna, por toda ajuda no desenvolvimento e aplicação do protocolo, e por todo carinho.

À equipe da Nutrição, em especial Glauce Yonamine, por todo conhecimento compartilhado, e pelo cuidado em elaborar tudo da melhor forma para os pacientes.

À equipe da cozinha do ITACI, pelo carinho especial ao preparar nossos muffins.

Aos médicos estagiários na Unidade de Alergia e Imunologia, meu agradecimento pelos momentos compartilhados e pela cooperação na realização da pesquisa, em especial a Priscila Macedo.

Aos pacientes com alergia alimentar e seus familiares por confiarem em nossa equipe, meu respeito e promessa de direcionar meus esforços para contribuir para uma melhor qualidade de vida.

A Mariza pelo auxílio na bibliografia, a Mônica pela ajuda em todas as minhas solicitações, ao Nivaldo pelo carinho com que finalizou este material.

Aos amigos, pela compreensão e apoio, meu muito obrigada.

Das Utopias

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A presença distante das estrelas!

Mario Quintana

NORMALIZAÇÃO ADOPTADA

Esta dissertação 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. Serviço 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: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Alergia a proteína do leite de vaca	2
1.2 Processos de modificação da alergenicidade.....	4
1.3 Tratamento da alergia a proteína do leite de vaca	6
1.3.1 Leite processado a altas temperaturas	8
1.4 Justificativa	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Principal.....	13
2.2 Secundários	13
3 METODOLOGIA.....	15
3.1 Tipo de estudo e casuística	15
3.2 Comitê de ética	15
3.3 Critérios de inclusão	16
3.4 Critérios de exclusão.....	16
3.5 Delineamento do estudo	17
3.6 Receita do LPAT	17
3.7 Protocolo de provocação LPAT.....	18
3.8 Definição de fenótipos.....	19
3.9 Protocolo de provocação LV	19
3.10 Coleta de dados clínicos e laboratoriais.....	20
3.11 Seguimento	21
3.12 Análise de dados	21
3.12.1 Análise das características clínicas	21
3.12.2 Análise das características laboratoriais	22
4 RESULTADOS	23

5 DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÕES.....	38
7 ANEXOS.....	40
ANEXO A - CAPPesq	40
ANEXO B - Termo de consentimento livre esclarecido	41
ANEXO C - Receita do <i>muffin</i> de chocolate preparado no ICr- HCFMUSP	44
ANEXO D - Ficha do protocolo de teste de provocação oral com leite processado a alta temperatura e leite de vaca <i>in natura</i>.....	45
ANEXO E - Receita do <i>muffin</i> de chocolate orientado ao paciente para consumo domiciliar diário.....	48
8 REFERÊNCIAS	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Alergia Alimentar
APLV	Alergia a Proteína do Leite de Vaca
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
Curva ROC	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>
ICr	Instituto da Criança
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
LPAT	Leite Processado a Altas Temperaturas
LV	Leite de Vaca
TDCPC	Teste Duplo Cego Placebo Controlado
TPO	Teste de Provocação Oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Efeito da exposição a altas temperaturas sobre a estrutura das proteínas e epítomos	5
Figura 2	Delineamento do estudo	17
Figura 3	<i>Muffin</i> preparado com 2,8 gramas de proteína do LV.....	18
Figura 4	Definição dos grupos reativo e não reativo ao LPAT após TPO com LPAT e TPO com LV	24
Figura 5	Sintomas apresentados pelos pacientes do grupo Reativo ao serem submetidos ao TPO para LPAT (n=16).....	25
Figura 6	Sintomas apresentados pelos pacientes do grupo Não Reativo ao LPAT ao serem submetidos ao TPO para LV (n=12)	25
Figura 7	Comparação dos Testes de puntura (mm) para α -Lactoalbumina entre os grupos Reativos e Não reativos ao LPAT (p=0,01)	28
Figura 8	Comparação dos Testes de puntura (mm) para Caseína entre os grupos Reativos e Não reativos ao LPAT (p=0,004)	28
Figura 9	Comparação dos valores de ImmunoCAP® (kU _A /L) para Caseína entre os grupos Reativos e Não reativos ao LPAT (p=0,05)	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características epidemiológicas e clínicas (médias, DP e frequência, percentual) dos grupos reativos e não reativos ao LPAT	27
Tabela 2	Características laboratoriais (eosinófilos e testes de puntura) dos grupos reativos e não reativos ao LPAT (médias, DP, IC 95%)	29
Tabela 3	Características laboratoriais (IgE total e específicas) dos grupos reativos e não reativos ao LPAT (medianas e IIQ)	30

RESUMO

Barbosa CPG. *Tolerância ao leite processado em altas temperaturas em pacientes com alergia ao leite de vaca mediada pela imunoglobulina E* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2015.

INTRODUÇÃO: A incidência de pacientes apresentando alergia à proteína do leite de vaca (APLV) após os 5 anos de idade vem crescendo. Definir se estes pacientes tolerariam a ingestão de alimento produzido com leite processado a altas temperaturas (LPAT) proporcionaria melhor qualidade de vida, definiria melhor prognóstico e possibilitaria avaliar a indicação de dessensibilização com *muffin*. **OBJETIVO:** (1) identificar quais pacientes com APLV persistente aos quatro anos poderiam tolerar a ingestão de LPAT, (2) descrever as características clínicas e laboratoriais dos grupos reativo e não reativo ao LPAT, e (3) compara-las entre os dois grupos. **MÉTODOS:** Estudo transversal, utilizando amostra de conveniência, incluindo todos os pacientes acompanhados no ambulatório de alergia alimentar do Instituto da Criança HCFMUSP que preenchessem os critérios de inclusão e que concordaram em realizar o TPO, entre janeiro/2013 e novembro/2014. Os pacientes foram admitidos em hospital-dia sob supervisão médica e submetidos à ingestão de um *muffin* contendo 2,8 gramas de proteína do leite de vaca. Foram definidos como tolerantes se não apresentassem nenhuma reação alérgica. Estes pacientes foram submetidos na sequência a novo TPO com leite de vaca *in natura* para excluir a tolerância ao leite de vaca. **RESULTADOS:** Foram realizados 38 TPO com LPAT, sendo que 30 pacientes (15 masculinos) preencheram todos os critérios de inclusão. A mediana da idade foi de 7 anos e 7 meses (4a10m -14a2m). 14 pacientes (46%) não apresentaram reação após a ingestão do *muffin*, sendo considerados como não reativos. A análise comparativa entre os grupos reativos e não reativos ao LPAT, não mostrou diferença estatisticamente significativa quanto às características clínicas: idade ($p=0,8$), sexo ($p=0,4$), história pessoal de rinite ($p=0,7$), história pessoal de asma ($p=0,7$), história pessoal de outras alergias ($p=0,6$), história familiar de rinite ($p=0,7$), história familiar de asma ($p=0,3$), história familiar de outras alergias ($p=0,1$), relato de anafilaxia prévia ($p=0,07$), relato de ingestão de traços de leite previamente ao TPO ($p=0,4$), relato de reação alérgica no último ano antes da provocação ($p=0,6$), relato de anafilaxia no último ano antes do TPO ($p=0,6$). Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos para IgE total ($p=0,1$) e eosinófilos ($p=0,6$). O teste de punção para leite de vaca e frações mostrou diferença estatisticamente significativa para α -lactoalbumina ($p=0,01$) e para a caseína ($p=0,004$); em relação ao ImmunoCAP® apenas para a caseína ($p=0,05$) essa diferença foi significativa. Ao avaliar estes pacientes 1 ano

após o TPO, nenhum dos 16 pacientes que foram reativos ao LPAT estava ingerindo leite de vaca, enquanto 28% dos pacientes que foram tolerantes ao LPAT estavam consumindo leite de vaca *in natura* sem reação ($p=0,037$). CONCLUSÃO: O estudo mostrou que os pacientes com APLV desta amostra brasileira apresentaram 2 diferentes fenótipos, sendo que aproximadamente metade tolerou o LPAT. Sendo assim, o TPO para LPAT deve ser considerado para pacientes com APLV, sempre sob supervisão médica e estrutura segura e adequada, pois pode contribuir para uma mudança no paradigma do seguimento destes pacientes. Teste de puntura e ImmunoCAP® para caseína podem sugerir quais pacientes estariam tolerantes ao TPO com LPAT, reforçando dados da literatura internacional.

Descritores: Hipersensibilidade Alimentar; Hipersensibilidade a Leite; Hipersensibilidade a Leite/diagnóstico; Hipersensibilidade a Leite/terapia; Hipersensibilidade a Leite/dietoterapia; Imunoterapia; Tolerância Imunológica; Dessensibilização Imunológica.

ABSTRACT

Barbosa CPG. *Tolerance of baked milk in patients with cow's milk allergy mediated by immunoglobulin E* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

INTRODUCTION: The incidence of patients with cow's milk allergy (CMA) after the age of 5 has been growing. Defining whether these patients can tolerate the ingestion of food produced with baked milk without allergy reaction could provide a better quality of life, a better prognosis and would make it possible to evaluate indication of desensitization with baked milk. **OBJECTIVE:** (1) To identify which patients with persistent CMA at the age of four could tolerate the baked milk, (2) to describe the clinical and laboratory characteristics of the baked milk reactive group and the baked milk non-reactive group, and (3) to compare those two groups. **METHODS:** A cross-sectional study was conducted between January/2013 and November/2014. A convenience sample was applied, including all the patients followed in the Food Allergy Center of the Instituto da Criança HCFMUSP, who met inclusion criteria and agreed to carry out the oral food challenge (OFC). The patients were admitted to a day-hospital under medical supervision. They were submitted to a muffin intake containing 2.8 grams of cow's milk protein, and then classified as tolerant if they did not present any allergic reaction. To exclude cow's milk tolerance these patients were submitted to a new OFC with cow's milk *in natura*. **RESULTS:** 38 OFC with baked milk were performed, 30 patients (15 male) met all of the inclusion criteria. The median of age was 7 years and 7 months (4y10m -14y2m). 14 patients (46.6%) were considered as non-reactive because they did not present any reaction after the muffin intake. The comparative analysis between baked milk reactive group and baked milk non-reactive group did not show statistically significant difference in the clinical characteristics: age ($p=0.8$), gender ($p=0.4$), personal history of rhinitis ($p=0.7$), personal history of asthma ($p=0.7$), personal history of others allergies ($p=0.6$), family history of rhinitis ($p=0.7$), family history of asthma ($p=0.3$) family history of others allergies ($p=0.1$), previous anaphylaxis report ($p=0.07$), report of milk traits intake prior to OFC ($p=0.4$), allergic reaction in the last year before the OFC ($p=0.6$), anaphylaxis in the last year before the OFC ($p=0.6$). There was no statistically significant difference between the two groups for total IgE ($p=0.1$) and eosinophils ($p=0.6$). The Prick test for cow's milk and fractions showed statistically significant difference for α -lactalbumin ($p = 0.01$) and for casein ($p = 0.004$); in relation to the ImmunoCAP® only for casein ($p=0.05$) this difference was significant. After 1 year of the OFC, none of the patients which have been reactive to the baked milk were ingesting cow's milk, while 28% of the baked milk tolerant patients were consuming cow's milk *in natura* without reaction ($p=0.037$). **CONCLUSION:** The present study showed that patients with CMA

of this brazilian sample presented 2 different phenotypes. Approximately half of them tolerated baked milk at age four. In conclusion, OFC for baked milk should be considered for patients with CMA, always under medical supervision and appropriate structure, so it could contribute for a change in these patients follow-up. Prick test and ImmunoCAP® for casein can suggest which patients would tolerate the OFC with baked milk, strengthening data of international literature.

Descriptors: Food Hypersensitivity; Milk Hypersensitivity; Milk Hypersensitivity/diagnosis; Milk Hypersensitivity/therapy; Milk Hypersensitivity/diet therapy; Immunotherapy; Immune Tolerance; Desensitization, Immunologic.

1 Introdução

---

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alergia a proteína do leite de vaca

A alergia a proteína do leite de vaca (APLV) é a alergia alimentar (AA) mais comum na infância, com uma prevalência de 2 a 3% nessa população (Bock, 1987; Host *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2010; Sicherer, 2011). É um significativo problema de saúde pública pelo risco de reação grave potencialmente fatal (Bock *et al.*, 2007), sendo o terceiro alimento desencadeante de anafilaxia alimentar em pacientes pediátricos avaliados por estudo australiano, após amendoim e castanha, correspondendo a 11% dos casos (De Silva *et al.*, 2008). O impacto na qualidade de vida dos pacientes e de suas famílias é evidente, pois a restrição alimentar é ampla, o que muitas vezes leva à diminuição da socialização por medo de escapes involuntários. O risco de déficit nutricional associado à restrição ao leite de vaca (LV) é grande, uma vez que este alimento é uma importante fonte de proteínas e de cálcio, em especial na infância (Kattan *et al.*, 2011).

Os mecanismos fisiopatológicos da hipersensibilidade ao leite podem ser mediados ou não pela Imunoglobulina E (IgE). Na alergia IgE mediada, fatores genéticos e ambientais se somam para induzir a sensibilização às proteínas presentes no LV, sendo as principais a caseína e as proteínas do soro, especialmente α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (Wal, 2004). Estes alérgenos induzem uma resposta Th2, com produção de interleucina (IL) 4, IL5 e IL13, ativando a produção de IgE específicas, que ao se ligarem aos mastócitos e com uma nova exposição ao alérgeno, levarão a liberação da histamina e outros mediadores (Fiocchi *et al.*, 2010).

Os sintomas da APLV IgE mediados podem se apresentar como manifestações relacionadas a pele (85%) como urticária, angioedema e eczema; sintomas gastrintestinais (46%) como vômitos, diarreia, sangramento nas fezes e sintomas de refluxo; sintomas do trato respiratório

baixo (14%) como tosse, sibilância; sintomas do trato respiratório alto (6%) como rinite e congestão nasal; e sintomas cardiovasculares, como hipotensão (Skripak *et al.*, 2007). Gushken e colaboradores (2007) descreveram, em estudo brasileiro, as manifestações clínicas apresentadas por pacientes com APLV em teste de provocação oral duplo cego placebo controlado (TDCPC): 86% de sintomas cutâneos, 64% respiratórios, 43% anafilaxia e 42% gastrointestinais, com muitos sintomas sobrepostos. Os sintomas podem variar de locais e leves, como a síndrome da alergia oral, até graves e potencialmente fatais como a anafilaxia, definida como o acometimento de dois ou mais sistemas após exposição a alérgeno, segundo critérios estabelecidos por Sampson e colaboradores (2006).

A descrição de sintomas sugestivos em até duas horas após a ingestão do LV, associado a dados laboratoriais de sensibilização avaliados pela dosagem de IgE específica no soro (ImmunoCAP®) ou teste de puntura (*Prick Test*) sugerem o diagnóstico de APLV IgE mediada. Os testes laboratoriais são de difícil interpretação, não havendo definição com relação a níveis de corte que pudessem indicar reatividade clínica. Manifestações clínicas diferentes ou idades diferentes podem contribuir para estas variações como o que foi observado em trabalho de Castro e colaboradores (2015). O método padrão ouro para diagnosticar uma alergia alimentar continua sendo o teste duplo cego placebo controlado (TDCPC), realizado em local adequado e equipe treinada (Solé *et al.*, 2008; Fiocchi *et al.*, 2010; Chafen *et al.*, 2010; Boyce *et al.*, 2010; Kattan *et al.*, 2011; Beigelman *et al.*, 2012).

Até recentemente, a história natural da APLV era descrita como passageira e com boa evolução, pois estudos mostravam que a maioria das crianças se tornava tolerante ao LV espontaneamente em idades precoces, sendo relatado que cerca de 80% delas seriam tolerantes aos três anos (Host *et al.*, 1990). No entanto, nos últimos anos têm-se encontrado resultados menos otimistas, como descrito em um centro de referência em Baltimore - EUA, que aos 4 anos apenas 19% tinham se tornados tolerantes, 42% aos 8 anos, 64% aos 12 anos e 79% aos 16 anos (Skripak *et al.*, 2007).

Estudo realizado na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (ICr HCFMUSP) – São Paulo, considerada como centro de referência para AA, identificou que 55% dos pacientes não estavam tolerantes ao LV aos 5 anos de idade (Jacob *et al.*, 2010). Outro estudo da mesma unidade encontrou como indicadores de persistência da APLV: presença de anafilaxia, sensibilização a outros alimentos e altas concentrações de IgE específica, em especial a caseína (Jacob *et al.*, 2009).

1.2 Processos de modificação da alergenicidade

Esforços têm sido realizados para avaliar e entender melhor a estabilidade, digestibilidade e alergenicidade de proteínas alimentares, por meio de estudos *in vitro*, em animais e *in vivo*. Existem vários métodos de processamento dos alimentos que induzem mudanças físicas, químicas e bioquímicas, com possível impacto sobre o potencial alergênico das proteínas, que pode aumentar, diminuir ou mesmo ser eliminado. Os processos térmicos são os de maior impacto, pois proteínas lábeis ao calor mudam de conformação. Desta maneira, para alguns alimentos o processamento térmico pode aumentar a alergenicidade ao formar agregados proteicos mais resistentes ao suco gástrico e com novos sítios de ligação para IgE, o que acontece, por exemplo, com amendoim e camarão. De maneira contrária, este mesmo processamento pode destruir um epítopo que depende da estrutura terciária da proteína (epítopo conformacional) para se ligar a IgE específica, diminuindo drasticamente seu potencial alergênico. Alguns exemplos são bem conhecidos, como a maçã (Mal d 1), a cenoura (Dau c), a proteína do ovo (ovoalbumina), e, mais recentemente, as proteínas do LV (principalmente a β -lactoglobulina) (Thomas *et al.*, 2007). Há, entretanto, proteínas alergênicas que se ligam a IgE através de sua estrutura primária (sequência linear de aminoácidos), e neste caso o processamento térmico é insuficiente para mudar a estrutura do epítopo

(epítos lineares). Componentes de alimentos alergênicos como o ovomucóide e a caseína são os principais exemplos da gênese de epítos lineares (Jarvinen *et al.*, 2001; Urisu *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2012; Konstantinou *et al.*, 2012) (Figura 1).

Figura 1- Efeito da exposição a altas temperaturas sobre a estrutura das proteínas e epítos FONTE: Adaptado de Konstantinou *et al.*, 2012.

Alguns estudos associaram a presença de IgE específica para epítos lineares da caseína, que são termoestáveis, como um dos fatores relacionados à persistência da APLV. Foi identificado em crianças que alcançaram a tolerância ao LV anticorpos IgE específicos principalmente contra epítos conformacionais (Vila *et al.*, 2001; Skripak *et al.*, 2007).

A possibilidade de processamento do leite em altas temperaturas pode interferir com seu potencial alergênico, mas é importante ressaltar que, devido as próprias características da composição deste alimento, a intensidade e o tempo de exposição ao calor podem não ser suficientes para induzir mudanças capazes de interferir na alergenicidade da proteína,

mantendo seu estado nativo, induzindo reatividade clínica (Bloom *et al.*, 2015).

Em um alimento preparado com LV, interações das proteínas alergênicas do LV com outros ingredientes da matriz também são fatores importantes envolvidos no processo de modificação da alergenicidade, pois ao serem submetidos a altas temperaturas formam estruturas intermoleculares que prejudicam a exposição do alérgeno ao sistema imune. O trigo, sendo um ingrediente comum às preparações, pode estar associado à diminuição do potencial alergênico em alimentos preparados com LV e processados em altas temperaturas (Nowak-Węgrzyn *et al.*, 2009; Monaci *et al.*, 2011).

O leite de vaca consumido no mundo industrializado passa por dois processos: homogeneização, quando o leite é processado entre 60 e 72°C por alguns segundos para que as partículas de gordura sejam quebradas e dispersadas uniformemente; e pasteurização, processo de aquecimento por 72 a 150°C por 1 a 15 segundos, para minimizar o número de microrganismos viáveis e destruir enzimas indesejadas. Estes dois processos não parecem ser suficientes para alterar significativamente a alergenicidade das proteínas. Por outro lado, estudos descrevem processos de cozinhar o leite por períodos mais longos ou temperaturas mais altas, capazes de alterar a alergenicidade das proteínas, em especial as proteínas do soro mais lábeis (β -lactoglobulina), como descrito acima (Konstantinou *et al.*, 2012)

1.3 Tratamento da alergia a proteína do leite de vaca

Atualmente não há cura para a APLV, e o tratamento tradicional recomendado pelos consensos tem sido exclusão total do LV e seus derivados da dieta, para evitar o risco de reação. Em lactentes orienta-se substituir o LV por fórmulas hipoalergênicas, tais como as extensamente hidrolisadas ou a base de aminoácidos, sendo esta última utilizada naqueles

que não toleram as anteriores. Em crianças maiores de 6 meses, pode-se recomendar outra fonte proteica, como a soja, para os casos de alergia IgE mediada. Deve-se também suplementar o cálcio quando necessário (Solé *et al.*, 2007; Kemp *et al.*, 2008; Fiocchi *et al.*, 2010; Chafen *et al.*, 2010; Luyt *et al.*, 2014; Martorell-Aragonés *et al.*, 2015). A exclusão total do leite melhora os sintomas, mas mantém crianças totalmente desprotegidas ao entrar em contato com quantidades mínimas do antígeno de maneira acidental, podendo levar a reações graves e potencialmente fatais. Por um tempo se acreditou que a exposição ao alérgeno, mesmo de maneira segura e sem reações, poderia retardar a tolerância por continuar estimulando a inflamação do epitélio do trato gastrointestinal e a produção de IgE, com continuidade da reatividade clínica (Wood, 2003). Hoje questiona-se se essa conduta na verdade representa uma falta de opção de tratamento e se outras alternativas podem ser pensadas para minimizar as limitações de uma vida com restrições alimentares, em especial o leite.

Considerando uma prevalência significativa de persistência da APLV em crianças maiores que cinco anos, seus riscos de reação potencialmente fatal e o prejuízo na qualidade de vida, há uma demanda crescente por novas opções terapêuticas. Neste contexto surge um novo conceito: o de que pequenas quantidades de leite ingeridas sucessivamente poderiam induzir a dessensibilização ou tolerância. A dessensibilização consiste em induzir uma imunomodulação de maneira que o paciente faça ingestão do alérgeno diariamente na dose recomendada sem reação. Estudos internacionais descrevem taxas de sucesso para dessensibilização entre 60 a 100% (Miceli Sopo *et al.*, 2010; Nowak-Wegrzyn *et al.*, 2011; Dupont *et al.*, 2012; Burks *et al.*, 2012; Alvaro *et al.*, 2015). O principal problema do processo de dessensibilização é a possibilidade de eventos adversos, que são frequentes, segundo relato de Vázquez-Ortiz e colaboradores (2013) 95% para LV. A maioria das reações é classificada como leve a moderada, não justificando a interrupção deste tipo de tratamento, mas podendo ser grave. A taxa de aquisição de tolerância é bem menos descrita, sendo considerada quando o paciente pode ingerir o alérgeno em qualquer

quantidade e quando quiser, sem necessidade de dose diária de manutenção (Vickery *et al.*, 2011; Pajno, 2011).

1.3.1 Leite processado a altas temperaturas

Baseado na possibilidade de definição de pacientes com diferentes fenótipos de APLV, um grupo de autores do Hospital Mount Sinai de Nova York que estuda alergia alimentar realizou uma série de estudos sequenciais que serão descritos a seguir. Inicialmente, Nowak-Wegrzyn e colaboradores, em 2008, publicaram a avaliação de 100 pacientes entre 2 e 17 anos com APLV, seguidos nesse hospital de referência em Nova York, por meio da provocação oral com produtos feitos com leite processado a alta temperatura (LPAT), um *muffin* e um *waffle*, contendo 1,3 gramas de proteína cada. Os autores consideraram neste processamento o uso de temperatura de 180°C, por um período mínimo de 30 minutos para o *muffin*, e de 260°C por 3 minutos para o *waffle*. Destes, 68 (75%) toleraram a ingestão destes produtos processados sem nenhuma reação. Na sequência estes pacientes foram submetidos a teste de provocação oral (TPO) para LV apenas se apresentassem IgE sérica para LV ≤ 15 kUA/L ou teste de puntura para LV ≤ 8 mm, valores de corte sugeridos em estudos americanos anteriores para 95% de valor preditivo positivo (Sporik *et al.*, 2000; García-Ara *et al.*, 2001; Sampson, 2001). Os autores não encontraram diferença para as características clínicas entre os grupos. O grupo que reagiu ao LPAT, comparado com o grupo tolerante, apresentava maiores valores do teste de puntura para LV e do ImmunoCAP® para o LV, caseína e β -lactoglobulina. Os pacientes tolerantes ao LPAT foram orientados a comer produtos processados em domicílio, de 1 a 3 porções por dia, contendo produtos comercializados com traços ou feitos em casa com 1,3 gramas de proteína nas mesmas condições de cozimento.

Um segundo estudo, em 2011, descreveu a evolução destes pacientes tolerantes ao LPAT durante uma média de 37 meses, que apresentaram 28

vezes mais chance de tolerar o LV quando comparados ao grupo reativo ao LPAT, concluindo que tolerar o LPAT seria um marcador de um fenótipo mais leve e transitório da APLV. Aproximadamente 10% deixaram de fazer a dieta com LPAT posteriormente, devido a questões como ansiedade e relato de reações em domicílio com alimentos com LV menos processado. Observou-se também que aqueles que introduziram o LPAT em sua dieta apresentaram mais chance de se tornarem tolerantes ao LV, quando comparados ao grupo que se mantinha em dieta de exclusão. Foi demonstrado diminuição no valor do IgE para caseína e β -lactoglobulina e aumento da IgG4 para caseína neste grupo que ingeria diariamente o LPAT, dando suporte à teoria da indução de mudanças imunológicas em direção a tolerância. Os autores concluíram que esta seria uma opção de dessensibilização, mais fácil de ser realizada, e com um índice de eventos adversos menor (Kim *et al.*, 2011). Alguns estudos posteriores avaliaram a eficácia, segurança e riscos da dessensibilização com LPAT, e sugeriram benefícios da inclusão de alimentos com LPAT na dieta dos pacientes que os toleravam (Konstantinou *et al.*, 2012; Netting *et al.*, 2013; Leonard *et al.*, 2015; Goldberg *et al.*, 2015).

Em 2012 o mesmo grupo publicou estudo relatando ter submetido 132 pacientes de 4 a 10 anos a TPO com LPAT, entre 2008 e 2011, encontrando 65% de pacientes tolerantes ao LPAT. Neste estudo identificou-se diferença significativa entre os grupos reativos e não reativos ao LPAT para as seguintes variáveis: teste de punção para LV, IgE específica para caseína e LV e reatividade de basófilos específica para leite (Ford *et al.*, 2013). Em outro estudo de Caubet e colaboradores (2012) foram avaliados os 225 pacientes descritos nos artigos citados anteriormente (Nowak-Wegrzyn *et al.*, 2008; Ford *et al.*, 2013), e constatou-se que houve diferença com significância estatística para os níveis de IgE específica para leite, caseína e β -lactoglobulina entre os grupos reativo e não reativo ao LPAT. Por meio da análise das curvas ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve*), concluíram que a IgE específica para caseína apresentou melhor acurácia para prever reatividade ao LPAT, considerando um ponto de corte de 20,2

kU_A/L para 95% de especificidade e de 4,95 kU_A/L para 95% de sensibilidade (Caubet *et al.*, 2012).

Bartnikas e colaboradores (2012) analisaram retrospectivamente 35 pacientes com APLV testados para LPAT em hospital de referência em Boston, de 3 a 18 anos. Pacientes consumiam *muffin* ou *cupcake* feitos em casa após orientação do serviço e eram testados com um total de 2,6g de proteína do leite. Destes, 83% toleraram produtos com LPAT. As crianças que toleraram o LPAT eram mais velhas, com significância estatística. Gênero e condições atópicas como asma, rinite e dermatite não foram associadas a maior risco de reagir ao LPAT. Neste estudo não se encontrou diferença significativa para os dados laboratoriais entre os grupos reativos e não reativos ao LPAT.

Mehr e colaboradores (2014), em centro na Austrália, submeteram 70 crianças entre 2 e 10 anos com APLV ao TPO para um *muffin* contendo 0,5 g de proteína do LV, entre 2010 e 2013. Encontraram 73% de tolerância ao LPAT. Os autores descreveram os seguintes indicadores clínicos para reatividade ao LPAT: diagnóstico de asma, uso de terapia profilática para asma, relato de reação alérgica imediata a outros tipos de alimentos e história de anafilaxia prévia ao LV. Não se encontrou diferença significativa para o teste de puntura para LV *in natura* ou para o próprio *muffin*.

Faraj e colaboradores (2012) avaliaram 14 pacientes que apresentavam teste de puntura positivo para LV *in natura* e teste de puntura negativo para extrato preparado a partir de um *muffin*. Na sequência estes pacientes foram submetidos ao TPO para LPAT e nenhum apresentou reatividade, sugerindo que a avaliação do teste de puntura para extrato preparado a partir de produto com LPAT poderia contribuir para identificar qual paciente reagiria ao LPAT.

Em todos os estudos descritos anteriormente sobre LPAT, os autores não se certificaram de que os pacientes realmente não se encontravam tolerantes ao LV, não realizando um TPO para LV em todos os pacientes. A utilização de uma faixa etária muito ampla também poderia induzir a vieses na alocação dos grupos tolerantes e reativos ao LPAT.

A forma correta de se identificar se um paciente com APLV pode tolerar um produto com LPAT deveria incluir um TPO com LPAT, uma vez que dados clínicos não contribuem para a diferenciação e dados laboratoriais ainda carecem de pontos de corte definitivos. O TPO é um método de difícil execução, uma vez que requer internação de curta duração com estrutura e equipe capacitada a tratar reação alérgica grave como anafilaxia. A Unidade de Alergia e Imunologia do ICr HCFMUSP – São Paulo possui estes critérios, por ser um centro de referência em alergia alimentar e já possuir em sua rotina a realização de TPO com outros alimentos (Gushken *et al.*, 2012).

1.4 Justificativa

Encontra-se na literatura um crescente número de pacientes que aos 5 anos continuam apresentando alergia à proteína do leite de vaca (APLV). Diante disso, definir se este paciente toleraria a ingestão de produtos preparados com LPAT proporcionaria melhor qualidade de vida, além de poder definir melhor prognóstico, prevendo tolerância futura mais precoce ao LV. Atualmente a única forma de identificar os pacientes tolerantes a produtos com LPAT é o teste de provocação oral com LPAT. A Unidade de Alergia e Imunologia do ICr HCFMUSP- São Paulo, já possui experiência com um protocolo de provocação oral com LV (Gushken *et al.*, 2012), e se propôs a realizar TPO para LPAT em pacientes com APLV persistente. Desta forma, poderia definir dois fenótipos entre os pacientes com APLV persistente nesta população: reativos e não reativos ao LPAT, caracterizando-os clínica e laboratorialmente.

2 Objetivos

---

2 OBJETIVOS

2.1 Principal

Identificar entre os pacientes com APLV persistente com pelo menos quatro anos de idade aqueles que poderiam tolerar a ingestão de leite processado a altas temperaturas (LPAT), e descrever suas características clínicas e laboratoriais.

2.2 Secundários

Comparar os marcadores clínicos e laboratoriais entre os grupos reativo e não reativo a alimentos produzidos com LPAT.

3 Metodologia

---

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo de estudo e casuística

Estudo transversal, utilizou uma amostra de conveniência, que incluiu todos os pacientes acompanhados no ambulatório de alergia alimentar do ICr HCFMUSP, São Paulo, que preencheram os critérios de inclusão e que concordaram em realizar os testes. Desde o início do funcionamento desse ambulatório em 2000 até os dias atuais já foram atendidos cerca de 521 pacientes com suspeita de APLV, sendo 293 casos confirmados. Entre os pacientes com APLV acima de cinco anos de idade (n=145) observou-se que apenas 78 estavam tolerantes nesta idade (dados atualizados não publicados).

Os testes de provocação foram aplicados entre janeiro de 2013 e novembro de 2014. O pesquisador que realizou o TPO não tinha acesso aos dados laboratoriais recentes de cada paciente no momento do teste.

3.2 Comitê de ética

O protocolo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Departamento de Pediatria (ICr) e da CAPPesq (Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP) sob nº 9493, parecer - 121.044, ano 2012 (Anexo A).

3.3 Critérios de inclusão

A amostra do estudo consistiu em pacientes com idade superior a quatro anos e inferior a 18 anos matriculados no Ambulatório de Alergia Alimentar da Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança, com diagnóstico de alergia ao leite de vaca IgE mediada, que preencheram todos os critérios de inclusão abaixo descritos.

- Diagnóstico atual de APLV IgE mediada baseada em:
  - ✓ História clínica compatível com manifestações IgE mediadas até 2 horas após exposição ao leite de vaca,
  - ✓ IgE específica positiva para LV e/ou frações (ImmunoCAP® $\geq$ 0,35 kUA/L ou teste de puntura com diâmetro $\geq$ 3 mm).
  - ✓ Resposta clínica ao teste de provocação oral ao leite, duplo cego placebo controlado (exceto aqueles com história de anafilaxia), no momento do diagnóstico de APLV.
- Leitura, concordância e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos pais ou responsáveis legais e assinatura do termo de assentimento pelos adolescentes (Anexo B).

3.4 Critérios de exclusão

- Gravidez
- Processo infeccioso agudo
- Doença crônica em tratamento com imunossupressores
- Asma descontrolada
- Dermatite atópica
- Diagnóstico de esofagite eosinofílica
- Reação recente (no último ano) a produtos com leite processado a altas temperaturas (LPAT)

- Diagnóstico de alergia a ingredientes utilizados na preparação do LPTA (soja, ovo ou trigo)
- Teste de provocação oral negativo para leite de vaca *in natura* (pacientes tolerantes ao LV)

3.5 Delineamento do estudo

Figura 2 - Delineamento do estudo

3.6 Receita do LPAT

A preparação foi produzida e padronizada pela equipe da nutrição do Instituto da Criança, treinada e capacitada, sempre no dia anterior a cada provocação. Cada *muffin* possuía 2,8 gramas de proteína do LV (equivalente a aproximadamente 90 mL de LV), submetido ao forno aquecido a 180-250°C por 30 minutos, conforme referência em literatura, adaptada à

culinária brasileira (Nowak-Wegrzyn *et al.*, 2008). O modo de preparo consistia em: misturar 100g de farinha de trigo, 85g de açúcar, 45g de chocolate em pó sem LV (Nestlé®) em um recipiente; acrescentar 1 ovo, 35g de óleo vegetal e 100g de água; misturar até a massa ficar uniforme; por último acrescentar 5g de fermento em pó; despejar a massa sobre a forma de *muffin* (untada com óleo e farinha), dividindo-a em 6 partes iguais (Figura 3); em cada massa de *muffin*, ao final, acrescentar o leite em pó (8g do leite em pó *La sereníssima*® desnatado, que contém o correspondente a 2,8g de proteína do leite de vaca), misturando bem, garantindo a uniformidade do conteúdo proteico em cada *muffin*; assar o *muffin* em forno pré-aquecido a 180° por 15 minutos, certificando-se o cozimento até o centro do *muffin* (Anexo C). A opção pelo leite especificado acima foi baseada na escolha do produto com maior concentração proteica encontrado pela equipe, podendo ser substituído por outro leite, calculando-se dose equivalente.

Figura 3 - *Muffin* preparado com 2,8 gramas de proteína do LV

3.7 Protocolo de provocação LPAT

Os pacientes selecionados foram admitidos em hospital-dia, com acesso venoso e monitorização, sob supervisão médica da equipe da unidade, incluindo a pesquisadora. Todos os pacientes foram testados para

o LPAT, e os que não reagiram foram também testados para LV *in natura*, se possível no mesmo dia, para exclusão de desenvolvimento de tolerância.

Cada paciente recebeu um quarto da porção a cada 15 minutos, sendo avaliado clinicamente antes de cada dose (queixas do paciente, exame físico e pico de fluxo expiratório), e mantida a observação por duas horas após a provocação. A provocação era interrompida ao primeiro sinal de reação objetiva, sendo o paciente devidamente assistido e medicado com anti-histamínico, corticóide e adrenalina, quando houve indicação.

3.8 Definição de fenótipos

Os pacientes foram definidos como: reativos aqueles que apresentaram qualquer tipo de reação alérgica que necessitasse de medicação e não reativos quando não apresentaram nenhuma reação alérgica após a ingestão do LPAT.

3.9 Protocolo de provocação LV

Para excluir a tolerância já adquirida ao LV, os pacientes não reativos ao LPAT foram provocados com LV *in natura*, conforme citado anteriormente. Seguiu-se protocolo da unidade para teste de provocação ao LV aberto, mantendo o paciente em hospital-dia com acesso venoso e monitorizado, administrado a cada 15 minutos quantidades progressivas de LV até um total de 100 ml, com oferta de mais 200 ml para finalizar, totalizando aproximadamente 10g de proteína de LV, avaliado clinicamente antes de cada dose. O teste foi interrompido ao se identificar manifestação clínica objetiva de reação alérgica, sendo o paciente devidamente medicado e assistido (Gushken *et al.*, 2012).

3.10 Coleta de dados clínicos e laboratoriais

Todos os pacientes foram categorizados quanto a características clínicas e epidemiológicas conforme questionário (Anexo D) preenchido por responsável antes do teste que incluía: sexo, história de anafilaxia prévia, relato de ingestão de traços de leite na dieta previamente, relato de reação alérgica ao LV no último ano, história de anafilaxia no último ano, história pessoal de rinite, história pessoal de asma, história pessoal de outras alergias, história familiar de rinite, história familiar de asma, história familiar de outras alergias.

Antes do teste de provocação todos os pacientes foram submetidos ao teste de puntura e dosagem de eosinófilos, IgE total e IgE sérica específica (ImmunoCAP®) para LV e frações, por pesquisadores diferentes do pesquisador responsável pelos TPO com LPAT e/ou LV. O teste de puntura (*Prick test*) foi realizado por médico habilitado segundo a técnica modificada de Pepys (1975), utilizando materiais padronizados como lancetas de plástico descartáveis e individuais para cada extrato, incluindo LV e frações: α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e caseína. O teste foi realizado no antebraço da criança com a aplicação de gotas dos extratos e dos controles negativo (água destilada) e positivo (histamina 1 mg/mL), observando-se a distância mínima de 2 cm entre cada extrato. Os resultados foram lidos após 15 minutos da aplicação. O critério de positividade foi o mesmo utilizado por Williams e colaboradores (1999), considerando positivo os resultados cujas medidas de pápulas foram maiores ou iguais a 3 mm em relação ao controle negativo. O ImmunoCAP® (Thermo Fisher Scientific; Uppsala, Sweden) foi realizado conforme metodologia detalhada pelo fornecedor (Axen *et al.*, 1988) para LV e suas frações: α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e caseína, com valor de corte para positividade maior que 0,35 kU_A/L.

3.11 Seguimento

Os pacientes reativos ao LPAT foram orientados a manter a dieta de exclusão e os pacientes tolerantes ao LPAT foram orientados a consumir diariamente *muffin* produzido em domicílio segundo receita fornecida contendo 1,4g de proteína do LV, além de se liberar alimentos contendo traços de leite (Anexo E). Os objetivos deste projeto não incluíam o seguimento a longo prazo destes pacientes, mas ao final de 12 meses do TPO para LPAT pode-se rever os casos para descrever sua evolução.

3.12 Análise de dados

Para análise dos dados, foi utilizado o programa R Versão 3.2.2. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Considerando uma hipótese nula de que 25% ou mais dos pacientes avaliados seriam não reativos ao LPAT, o poder do estudo seria de 82,9%; e com uma hipótese nula de que 10% ou mais dos pacientes seriam não reativos ao LPAT, o poder do estudo seria de 99,8%

3.12.1 Análise das características clínicas

A idade foi descrita pelas médias e a comparação entre os dois grupos pelo *teste t*. As variáveis nominais foram descritas em frequência, sendo que a comparação entre os grupos de pacientes reativos ao LPAT e não reativos foi realizada por meio do *teste exato de Fisher* (História de anafilaxia prévia, Relato de ingestão de traços de leite na dieta previamente, História de anafilaxia no último ano, História pessoal de rinite, História pessoal de outras alergias, História familiar de asma, História familiar de outras alergias, Ingestão de LV após 1 ano do teste) ou *Qui-quadrado de Pearson*, quando

preencheram critérios para este teste (Sexo, Relato de reação alérgica ao LV no último ano, História pessoal de asma, História familiar de rinite).

3.12.2 Análise das características laboratoriais

Por meio do teste de Shapiro-Wilk e em conjunto com a análise de assimetria e Kurtosis, verificou-se a normalidade da distribuição de dados para as variáveis eosinófilos e teste de puntura para leite e frações, de maneira que foram descritos na forma de média, desvio-padrão e intervalo de confiança, e comparou-se os grupos reativos e não reativos ao LPAT por meio do *teste t*.

Os resultados da IgE total e do ImmunoCAP® foram descritos em medianas e intervalos interquartis, sendo a comparação entre os dois grupos realizada por meio do *teste de Mann-Whitney*.

4 Resultados

---

4 RESULTADOS

Foi realizado TPO com LPAT em 38 pacientes com APLV persistente aos 4 anos que estavam matriculados no ambulatório de AA do ICr HCFMUSP – São Paulo. Destes, 4 pacientes não puderam concluir o teste, pois não conseguiram ingerir a totalidade do *muffin*, sendo excluídos da amostra. Outros 4 pacientes também foram excluídos do estudo por se mostrarem tolerantes tanto ao LPAT como ao LV *in natura*, testado em seguida. Desta maneira, 30 pacientes preencheram todos os critérios de inclusão e exclusão, incluindo reação alérgica ou TPO positivo recente para o LV, confirmando a persistência da APLV. Apenas 2 pacientes não realizaram o TPO para leite de vaca *in natura* por terem apresentado sintomas clínicos após ingestão acidental no último ano.

A mediana da idade dos 30 pacientes foi de 7 anos e 7 meses (4a10m -14a2m), média de 8 anos ($\pm 30,7$), sendo que 15 eram do sexo masculino (50%).

Ao serem provocados para LPAT, 14 pacientes (46,7%) não apresentaram reação após a ingestão do *muffin*, sendo considerados como não reativos ao LPAT.

Figura 4 - Definição dos grupos reativo e não reativo ao LPAT após TPO com LPAT e TPO com LV

O grupo de reativos ao LPAT foi composto de 16 pacientes, com mediana e média de idade de 8 anos (4a10m-13a11m, $\pm 2a4m$), sendo 7 do sexo masculino (44%). Destes, 5 apresentaram sintomas de pele (urticária e/ou angioedema); 6 apresentaram sintomas respiratórios (rinorréia, espirros, tosse e/ou sibilos); 1 apresentou apenas sintomas gastrointestinais imediatos (dor abdominal e vômitos). Os pacientes que apresentaram sintomas em mais do que um aparelho se encontravam no grupo anafilático, composto por 4 pacientes. Estes apresentaram anafilaxia após o primeiro ou segundo quarto do *muffin*, com indicação de adrenalina intramuscular, sendo que três apresentaram sintomas de urticária com broncoespasmo e um apresentou urticária, broncoespasmo, dor abdominal e hipotensão (Figura 5).

Figura 5 - Sintomas apresentados pelos pacientes do grupo Reativo ao serem submetidos ao TPO para LPAT (n=16)

Os pacientes que não reagiram o LPAT foram 14, com mediana de idade de 6anos e 7meses e média de idade de 8 anos (4a11m-14a2m, $\pm$ 2a10m), sendo 8 do sexo masculino (57%). Destes, 2 pacientes não foram submetidos ao TPO com LV *in natura* por terem apresentado reação em escapes involuntários no último ano. Ao submeter os outros 12 pacientes a TPO com LV *in natura*, 7 apresentaram sintomas cutâneos (urticária e/ou angioedema), 3 apresentaram sintomas abdominais (dor abdominal e vômitos) e 2 apresentaram anafilaxia (Figura 6).

Figura 6 - Sintomas apresentados pelos pacientes do grupo Não Reativo ao LPAT ao serem submetidos ao TPO para LV (n=12)

Entre os pacientes submetidos a TPO para LV *in natura* (n=12), 7 apresentaram reação somente após ingestão de quantidade de LV equivalente a mais de 2,8 gramas de proteína do LV, quantidade contida em um *muffin*.

Ao fazer a análise comparativa entre os grupos reativos ao LPAT e não reativos ao LPAT, em relação às características clínicas não houve diferença com significância estatística quanto a idade ($p=0,87$) e sexo ($p=0,46$). Ao analisar dados da história pregressa destes pacientes, não se encontrou diferença com significância estatística entre os dois grupos para história pessoal de rinite ($p=0,70$), história pessoal de asma ($p=0,73$), história pessoal de outras alergias ($p=0,67$), história familiar de rinite ($p=0,73$), história familiar de asma ($p=0,31$) e história familiar de outras alergias ($p=0,10$) (Tabela1).

No grupo dos reativos ao LPAT 94% relatava anafilaxia prévia, e no grupo dos não reativos apenas 64% relatavam este achado clínico, porém sem diferença significativa ($p=0,07$). Da mesma maneira não se observou significância estatística ao comparar os dois grupos quanto ao relato de ingestão de traços de leite previamente ao teste de provocação ($p=0,41$) (Tabela1).

Ao analisar dados da história recente, não se identificou diferença entre os dois grupos quanto ao relato de reação alérgica no último ano antes da provocação ($p=0,65$). Vinte e cinco por cento do grupo reativo apresentou relato de anafilaxia no último ano antes do teste de provocação, e 14% do grupo não reativo, porém sem significância estatística ($p=0,65$) (Tabela1).

Tabela 1 - Características epidemiológicas e clínicas (médias e DP; frequências absolutas e percentuais) dos grupos reativos e não reativos ao LPAT

	LPAT		p
	Reativos (n=16)	Não Reativos (n=14)	
Idade (meses)	95 (±28)	97 (±35)	0,87 *
Sexo masculino	7 (44)	8 (57)	0,46 **
Anafilaxia prévia	15 (94)	9 (64)	0,07 ***
Ingestão de traços de LV	3 (19)	5 (36)	0,41 ***
Reação LV no último ano	9 (56)	9 (64)	0,65 **
Anafilaxia no último ano	4 (25)	2 (14)	0,65 ***
HP de rinite	10 (62)	10 (71)	0,70 ***
HP de asma	9 (56)	7 (50)	0,73 **
HP de outras alergias	3 (19)	4 (29)	0,67 ***
HF de rinite	9 (56)	7 (50)	0,73 **
HF de asma	1 (6)	3 (21)	0,31 ***
HF de outras alergias	2 (12)	6 (43)	0,10 ***

HP – História pessoal HF – História familiar

*Teste t ** Qui-quadrado de Pearson *** Teste Exato de Fisher.

Em relação às características laboratoriais, não se observou diferença significativa entre os dois grupos para eosinófilos ($p=0,63$) e para IgE total ($p=0,13$). Ao comparar o teste de punção entre os pacientes dos dois grupos, houve diferença com significância estatística para α -lactoalbumina ($p=0,01$) e para a caseína ($p=0,004$) (Tabela 2) (Figuras 7 e 8). Comparando-se os ImmunoCAP® entre os dois grupos encontrou-se diferença com significância estatística apenas para a caseína ($p=0,05$) (Tabela 3) (Figura 9).

Figura 7 - Comparação dos Testes de puntura (mm) para α -Lactoalbumina entre os grupos Reativos e Não reativos ao LPAT ($p=0,01$)

Figura 8 - Comparação dos Testes de puntura (mm) para Caseína entre os grupos Reativos e Não reativos ao LPAT ($p=0,004$)

Figura 9 – Comparação dos valores de ImmunoCAP® (kUA/L) para Caseína entre os grupos Reativos e Não reativos ao LPAT ($p=0,05$)

Houve perda nos dados laboratoriais em alguns pacientes: 2 casos no número de eosinófilos (ambos de pacientes do grupo não reativo), 9 IgE totais (5 do grupo reativo e 4 do grupo não reativo), 1 teste de puntura (do grupo não reativo) e 2 ImmunoCAP® (do grupo reativo).

Tabela 2 - Características laboratoriais (eosinófilos e testes de puntura) dos grupos reativos e não reativos ao LPAT (médias, DP, IC 95%)

	LPAT		IC 95%	p^*
	Reativos (n=16)	Não Reativos (n=13)		
Eosinófilos (eos/mm ³)	657(±374)	738(±523)	-429 a 267	0,63
TP LV (mm)	7 (±5)	6 (±3)	-1,84 a 4,66	0,37
TP α-Lactoalbumina (mm)	10 (±5)	5 (±4)	1,24 a 8,45	0,01
TP β-Lactoglobulina (mm)	7 (±5)	7 (±5)	-4,19 a 3,45	0,84
TP Caseína (mm)	7 (±4)	3 (±2)	1,26 a 6,07	0,004

TP – teste de puntura

* Teste t

Tabela 3 - Características laboratoriais (IgE total e específicas) dos grupos reativos e não reativos ao LPAT (medianas e IIQ)

	LPAT		<i>p</i> *
	Reativos (n=14)	Não Reativos (n=14)	
IgE Total (UI/mL)	229 (71-842)	591 (176-2210)	0,13
IgE LV (kU_A/L)	15,3 (8-51)	11,8 (2-35)	0,28
IgE α-Lactoalbumina (kU_A/L)	5,1 (0,6-21)	2,2 (0,8-19)	0,65
IgE β-Lactoglobulina (kU_A/L)	2,2 (0,6-24)	1,7 (0,2-5)	0,32
IgE Caseína (kU_A/L)	12,9 (7-43)	5,7 (0,5-49)	0,05

* Teste de Mann-Whitney

Entre os 14 pacientes que não apresentaram reatividade ao LPAT no TPO, 5 apresentaram posteriormente reação leve a moderada em domicílio ao ingerir LPAT diário conforme orientado. Nenhuma reação grave foi observada. Apenas 1 destes não continuou a ingestão do LPAT por referir dor abdominal intensa.

Ao avaliar estes pacientes um ano após o teste de provocação com LPAT, nenhum dos 16 pacientes que foram reativos ao LPAT estava ingerindo LV *in natura*, enquanto 4 (28%) dos pacientes que foram não reativos ao LPAT conseguia ingerir LV *in natura* sem reação, diferença com significância estatística ($p=0,037$).

5 Discussão

---

5 DISCUSSÃO

A maior relevância desse estudo foi demonstrar que entre os pacientes com APLV persistente de um ambulatório especializado em alergia alimentar do ICr HCFMUSP – São Paulo existem diferentes fenótipos, caracterizando uma heterogeneidade laboratorial e clínica, comparável com os poucos relatos na literatura internacional. Demonstrou-se que quase metade dos pacientes avaliados, ainda alérgicos ao LV, pode tolerar produtos preparados com leite processado a altas temperaturas (LPAT). Esta proporção difere dos demais estudos, nos quais a tolerância ao LPAT foi descrita entre 65% a 83% (Nowak-Wegrzyn *et al.*, 2008; Bartnikas *et al.*, 2012; Ford *et al.*, 2013; Mehr *et al.*, 2014). Uma provável justificativa para essa diferença é que este estudo limitou a amostra a crianças a partir de 4 anos de idade, por considerar os seguintes aspectos: existe a probabilidade de crianças até 4 anos desenvolverem a tolerância espontânea ao LV, portanto não justificando submetê-las a um procedimento de risco; as crianças menores que 4 anos apresentam maior dificuldade de completar o TPO, devido à menor colaboração e menor capacidade de ingerir o *muffin* por inteiro, fato que ocorreu em 4 pacientes neste estudo. Não foram encontrados estudos brasileiros desta natureza e os estudos sobre TPO para LPAT localizados na literatura internacional utilizaram amostras mais heterogêneas, pois a faixa etária incluía crianças e adolescentes entre 2 a 18 anos. Neste estudo, ao selecionar pacientes maiores de 4 anos, reduziu-se a possibilidade de incluir pacientes mais jovens que tolerariam mais precocemente o LV, com possível evolução benigna, tornando a amostra mais homogênea.

Esta casuística também se destaca pelo cuidado da presença de pesquisador que desconhecia a condição clínica e laboratorial prévia do paciente que poderia classificá-lo como tolerante ou não ao procedimento de TPO para LPAT. Descreve também uma técnica padronizada de TPO para

LPAT, adaptada à realidade de um centro brasileiro de referência em alergia alimentar (AA), com possibilidade de ser reproduzida em centros capacitados. A receita do LPAT foi baseada em dados da literatura internacional, e adaptada aos ingredientes disponíveis no comércio brasileiro, sendo fácil de reproduzir em outros serviços e em domicílio, caso seja interessante manter uma padronização para estudos multicêntricos. Esta receita conseguiu alcançar a quantidade de proteína de LV desejada (2,8g) em apenas 1 unidade de *muffin*, enquanto outros estudos necessitavam de 2 unidades, demandando mais tempo e dificuldade de ingestão total dos produtos (Nowak-Wegrzyn *et al.*, 2008; Bartnikas *et al.*, 2012; Ford *et al.*, 2013). Outros fatores importantes foram as características organolépticas do *muffin*, detalhes que facilitaram a aderência dos pacientes no momento do teste e após, para consumo domiciliar regular.

Uma consideração importante é que o *muffin* oferecido no TPO possuía 2,8g de proteína de LV, enquanto no TPO para LV *in natura*, habitualmente é utilizado cerca de 10g de proteína. Uma grande dificuldade é conseguir elaborar uma receita que concentrasse uma quantidade maior da proteína em um único LPAT. Portanto, não se pode excluir que a não reatividade no TPO para LPAT tenha sido devido a ingestão de pequena quantidade do antígeno. Essa hipótese pode ser corroborada pelos achados de nosso estudo, pois no TPO para LV feita na sequência para estes pacientes, 58% apresentou reação apenas após uma quantidade de proteínas do LV superior a 2,8g.

Importante ressaltar que todos os pacientes tolerantes ao LPAT foram na sequência submetidos ao TPO para LV, para descartar tolerância ao LV, exceto aqueles que apresentaram reatividade clínica ao LV no último ano. Ao assumir a reatividade ao LV por meio de pontos de corte de dados laboratoriais, como descrito por Nowak-Wegrzyn e colaboradores (2008) e Ford e colaboradores (2013), e não utilizando o método padrão-ouro com TDCPC, poderíamos incorrer em erros, incluindo pacientes tolerantes a esse alimento. Mesmo sendo um estudo transversal, ao utilizar dados laboratoriais colhidos simultaneamente ao TPO com LPAT, reduziu-se as

chances de vieses associados a exames coletados temporalmente defasados em relação ao TPO, como pode ter ocorrido em estudo retrospectivo de Bartnikas e colaboradores (2012).

Uma observação interessante do estudo de Nowak-Wegrzyn e colaboradores (2008) é que nenhum paciente que tolerou o LPAT apresentou anafilaxia ao LV, sugerindo que este grupo poderia reagir menos gravemente ao LV. Em contrapartida, no presente estudo, a presença de anafilaxia em 2 pacientes tolerantes ao LPAT quando provocados com LV, mostrou que estes pacientes podem apresentar reação grave se em contato com o leite *in natura*. Desta forma, ao liberar o LPAT para a dieta, é preciso que o paciente e seus familiares estejam bem orientados a manter a exclusão do LV *in natura* e instruídos quanto ao preparo do alimento com LPAT em todas as suas etapas. Entre 14 pacientes que não apresentaram reatividade ao LPAT no TPO, 5 apresentaram posteriormente reação leve e/ou moderada em domicílio ao ingerir LPAT diário conforme orientado, o que não impediu a continuidade da ingestão do LPAT. Esse fato provavelmente pode ser devido ao cozimento insuficiente para alterar a conformação das proteínas ou a outros fatores associados como infecções, jejum prolongado, atividade física, entre outros (Simons *et al.*, 2015). Importante destacar para a família a importância da forma de preparo do alimento e que sempre um adulto observe o paciente após a ingestão, pela possibilidade de reações.

Outro aspecto importante deste estudo é avaliar possíveis fatores de risco para definição de reatividade ao LPAT. Identificar a presença de marcadores clínicos e laboratoriais que possam predizer se o paciente irá tolerar o LPAT facilitaria a indicação de quais pacientes poderiam ser submetidos ao TPO. Não se identificou diferença com significância estatística ao comparar as características clínicas entre os 2 grupos. Estes dados reforçam achados de alguns estudos internacionais (Nowak-Wegrzyn *et al.*, 2008; Bartnikas *et al.*, 2012) e diferem do estudo de Mehr e colaboradores (2014) que encontrou diferença para asma e história prévia de anafilaxia ao LV. O relato de ingestão de traços em domicílio sem reação

previamente ao TPO nesse estudo não consistiu em fator de proteção para a reatividade ao LPAT, o que era esperado. Não há, no Brasil, legislação para a quantificação de traços, podendo funcionar como um fator de confusão para pais e cuidadores na avaliação da quantidade de proteína do leite ingerida. A possibilidade de grave reação adversa, não dispensa que o teste seja feito sob supervisão médica e ambiente seguro.

Em relação às características laboratoriais, neste estudo encontrou-se significância estatística para teste de puntura para α -lactoalbumina e para caseína, além do ImmunoCAP® para caseína. Isto difere do estudo de Bartnikas e colaboradores (2012) que não encontrou diferença com significância entre os dados laboratoriais, com as mesmas ressalvas anteriormente apontadas, por se tratar de estudo retrospectivo com exames laboratoriais não colhidos contemporaneamente ao TPO, e por não ter realizado TPO para LV em todos os pacientes. Por outro lado, estes dados reforçam um dos achados dos estudos de Nowak-Wegrzyn e colaboradores (2008) e Ford e colaboradores (2013), que mostraram diferença com significância estatística da IgE específica para caseína entre os grupos reativo e não reativo ao LPAT, indicando que a caseína pode ser um marcador importante para definir prognóstico e reatividade ao LPAT no paciente com APLV.

Estudo de Bartnikas e colaboradores (2012) avaliou por meio de curva ROC pontos de corte para IgE específico para caseína. ImmunoCAP® para caseína apresentou baixa sensibilidade e especificidade em predizer desfecho do TPO para LPAT, porém o teste de puntura apresentou um valor preditivo negativo (VPN) de 92% para valores > 9mm. Transpondo este valor de corte de teste de puntura para caseína nos pacientes desta casuística, a reatividade ao LPAT seria observada em todos os casos.

Na possibilidade de determinação de um ponto de corte para IgE específica para caseína, Caubet e colaboradores (2012) descreveram um valor de 20,2 kU_A/L para 95% de especificidade e de 0,94 kU_A/L para 95% de sensibilidade. Neste atual estudo, em uma tentativa de comparar as casuísticas utilizando-se os mesmos pontos de corte do ImmunoCAP® para

caseína, entre os pacientes com valores $>20,2$ kU_A/L (n=9), 5 reagiram ao LPAT; e entre os pacientes com valores de IgE específica para caseína $<0,94$ kU_A/L (n=5), todos foram não reativos ao LPAT. Uma crítica para esta conduta é o fato de que a população para a qual foram definidos estes pontos de corte apresentam características genéticas e hábitos dietéticos diferentes da população brasileira, devendo ser mais adequado que sejam definidos pontos de corte em cada população estudada e em amostra de tamanho mais significativo.

A maior limitação do estudo é seu tamanho amostral e perdas de dados laboratoriais. Embora estudos com maior número de pacientes incluídos sejam sugeridos, a exigência de estrutura hospitalar adequada e monitorização médica intensa dificultam sua realização.

Na tentativa de dar continuidade ao presente estudo, mesmo não fazendo parte dos objetivos iniciais, propôs-se o seguimento clínico do grupo de pacientes aqui analisados. Ao avaliar os pacientes após 1 ano do TPO, 4 dos pacientes que não reagiram ao LPAT, e seguiram ingerindo o *muffin* diariamente em domicílio, já estavam ingerindo LV *in natura* sem reação, seja por indicação médica, seja por iniciativa dos próprios pacientes e familiares. Por outro lado, nenhum dos pacientes reativos ao LPAT estava ingerindo LV, mantendo dieta de exclusão total. Vale ressaltar que não foi realizado novo TPO para LV *in natura* em nenhum dos dois grupos. Esta comparação simples mostrou que de alguma forma o grupo não reativo ao LPAT foi beneficiado ao ser orientado a introduzir LPAT em sua dieta, sendo que 29% alcançou o objetivo final de consumir LV *in natura* sem reação. Não se pode concluir, porém, que o consumo do LPAT foi o único fator para a dessensibilização destes pacientes, pois não se comparou a um grupo controle com as mesmas características. Ao considerar o paciente como não reativo ao LPAT, a equipe médica e os familiares se sentiram encorajados a expor os pacientes a quantidades crescentes de LV mais precocemente.

Avaliar se o paciente com APLV persistente reage ou não ao LPAT pode representar uma alternativa aos atuais tratamentos de APLV que se baseiam na restrição total de LV e seus derivados ou na dessensibilização

com LV *in natura*. Ao liberar a ingestão de produtos com LPAT promove-se uma considerável melhoria na qualidade de vida do paciente e a opção de dessensibilização com LPAT pode ser promissora, com perspectiva de indução mais precoce da tolerância ao LV.

6 Conclusões

---

6 CONCLUSÕES

1. Foram identificados dois fenótipos diferentes entre os pacientes com APLV persistente após 4 anos de idade: reativos e não reativos ao leite processado a altas temperaturas (LPAT), distribuídos de maneira equitativa nos dois grupos.
2. O teste de provocação oral (TPO) utilizando um produto preparado com leite processado a altas temperaturas (LPAT) em forma de *muffin* foi capaz de diferenciar pacientes reativos e não reativos ao LPAT.
3. As características epidemiológicas e clínicas não foram capazes de diferenciar os grupos reativos e não reativos ao leite processado a altas temperaturas (LPAT) neste estudo.
4. A caseína (teste de puntura e ImmunoCAP®) e α -lactoalbumina (teste de puntura) mostraram-se marcadores laboratoriais mais elevados em pacientes que reagiram ao leite processado a altas temperaturas (LPAT), sugerindo uma possibilidade de triagem prévia à realização do teste de provocação oral (TPO) com LPAT.

Considerando que os exames laboratoriais atuais não podem prever com segurança a presença da tolerância ao leite processado a altas temperaturas (LPAT), o teste de provocação oral utilizando LPAT é o método indicado para definir a reatividade a esta preparação. Pacientes que toleram o LPAT fazem parte de um subgrupo de pacientes com APLV que podem se beneficiar com a introdução de produtos preparados com LPAT, possibilitando uma melhor qualidade de vida, e almejando uma tolerância mais precoce ao leite de vaca em todas as suas formulações.

7 ANEXOS

Anexo A – Aprovação CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP 1066
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: TOLERÂNCIA AO LEITE PROCESSADO EM ALTAS TEMPERATURAS EM PACIENTES COM ALERGIA AO LEITE DE VACA MEDIADA PELA IMUNOGLOBULINA E

Pesquisador Responsável: Cristina Miuki Abe Jacob

Versão: 1

Pesquisador Executante: Claudia Plech Garcia Barbosa

CAAE: 07411512.9.0000.0068

Co-autores: Ana Paula BM Castro, Glaucé Hiromi Yonamine, Andrea K Gushken, Cleonir L Beck
Finalidade Acadêmica: Mestrado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: PEDIATRIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9493

Número do Parecer: 121.044

Data da Relatoria: 03/10/2012

Apresentação do Projeto: TOLERÂNCIA AO LEITE PROCESSADO EM ALTAS TEMPERATURAS EM PACIENTES COM ALERGIA AO LEITE DE VACA MEDIADA PELA IMUNOGLOBULINA E.

Objetivo da Pesquisa: Trata-se de estudo prospectivo com objetivo de identificar entre os pacientes com Alergia ao Leite de Vaca (ALV) persistente aos cinco anos aqueles que podem tolerar a ingestão de produtos com Leite Processado em Altas Temperaturas (LPAT).

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Entre a população de pacientes com ALV persistente pode haver um grupo que tolera LPAT, caracterizando pacientes que, no futuro, podem se beneficiar da dessensibilização com LPAT, tolerando o LV in natura mais precocemente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Trata-se estudo bem redigido e relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os dois TCLES estão adequados.

Recomendações: Sem pendências éticas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sugerimos aprovação do estudo.

Situação do Parecer: Aprovado.

São Paulo, 15 de Outubro de 2012

PROF. DR. ALFREDO MANSUR
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo B – Termo de consentimento livre esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

- 1. NOME:** .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....
- 2. RESPONSÁVEL LEGAL** .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
.....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
.....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

- 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** TOLERÂNCIA AO LEITE PROCESSADO EM ALTAS TEMPERATURAS EM PACIENTES COM ALERGIA AO LEITE DE VACA MEDIADA PELA IMUNOGLOBULINA E
- 2. PESQUISADORA EXECUTANTE:** CLAUDIA PLECH GARCIA BARBOSA
CARGO/FUNÇÃO: MÉDICA PESQUISADORA DA UNIDADE DE ALERGIA E IMUNOLOGIA DO ICR HCFMUSP
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 136385
UNIDADE DO HCFMUSP: UNIDADE DE ALERGIA E IMUNOLOGIA DO ICR HC FMUSP
MÉDICA RESPONSÁVEL: CRISTINA MIUKI ABE JACOB
- 3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**
RISCO MÍNIMO	☐	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	x
- 4. DURAÇÃO DA PESQUISA :** UM ANO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Justificativa e os objetivos da pesquisa: As pessoas com alergia ao leite devem evitar todos os alimentos que contenham este ingrediente e estão sujeitas a reações graves quando entram em contato de maneira involuntária. Não há um tratamento para a doença, exceto a orientação de dieta de exclusão de leite e derivados. A tolerância espontânea pode ocorrer na maior parte dos pacientes, mas, cada vez mais, este processo tem acontecido mais tardiamente na vida dos pacientes. Recentemente, tem sido descrito que alguns pacientes com alergia ao leite podem tolerar alimentos feitos com leite processado a altas temperaturas, submetido ao forno aquecido a 180 a 250°C por trinta minutos. Esta pesquisa está sendo realizada para ver se seu filho (a), que tem alergia a proteína do leite de vaca, pode comer estas preparações. Se ele (a) conseguir comer estes alimentos, sem reações, poderemos orientar a ingestão de alimentos com leite preparados no forno em casa, melhorando bastante a qualidade de vida dele(a).

Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais e procedimentos rotineiros: Primeiro, serão repetidos os exames de alergia do seu filho(a) para saber se a doença dele(a) está ativa ou não. Caso ela esteja ativa, vamos fazer o teste de provocação oral com os alimentos preparados no forno, em geral um bolo especial. Se ele(a) já fez este teste você vai lembrar que o paciente fica na enfermaria, onde são realizados também testes alérgicos na pele e no sangue. Neste dia, ele(a) ficará com um soro, para receber medicação caso seja necessário. A medicação será aplicada se ele(a) tiver qualquer reação após a ingestão do alimento com leite, preparado no forno. Para um cuidado bem rigoroso, ele(a) ficará sob supervisão médica da equipe da unidade de alergia e imunologia, incluindo a pesquisadora do estudo, que você e seu filho(a) já conhecem. O teste será assim: ele(a) receberá um pedaço do bolo a cada 15 minutos, sendo avaliado pela médica responsável antes de comer cada porção e mantida a observação por duas horas após o término do teste. A prova será interrompida ao primeiro sinal de reação e ele(a) será medicado com as medicações antialérgicas e adrenalina, se necessário.

Os desconfortos esperados relacionados ao procedimento: Este teste de provocação não é isento de risco, pois ele(a) poderá ter as mesmas reações que tem hoje, quando entra em contato com o leite. Ele(a) poderá apresentar reações como urticária, falta de ar, irritação na boca e até choque anafilático. A equipe médica está ciente disto e está preparada para atendê-lo(a), inclusive com assistência dos médicos da UTI. Ele(a) só receberá alta após sua completa recuperação.

Benefícios que poderão ser obtidos: O principal benefício deste estudo é a possibilidade de seu filho(a) poder ingerir alimentos que têm leite, assados a alta temperatura. Isto vai proporcionar a ele(a) e toda a família, uma alimentação mais variada, que poderá melhorar bastante a qualidade de vida de todos.

Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas: Se seu filho(a) participar do estudo, você será esclarecido(a) de todos os procedimentos que serão realizados, será informado dos riscos e benefícios e a qualquer tempo poderá pedir qualquer informação que desejar.

Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência: A participação ou não do seu filho(a) no estudo depende de sua autorização e se você consentir na participação dele(a), deverá assinar esse Termo de Consentimento, mas é importante que você tenha entendido tudo. Você é livre para desistir a qualquer momento desse estudo, e se decidir que seu filho(a) não deve participar, isto não afetará de nenhuma maneira a qualidade de tratamento que ele(a) recebe em nossa Unidade. Ele(a) continuará a ter o atendimento com os médicos e com a nutricionista para orientações, da mesma forma que era atendido antes.

Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade: Se você aceitar a participação dele(a) no estudo, todos os seus registros médicos serão armazenados em um computador para fins da pesquisa e não serão divulgados. Somente a equipe médica saberá quais informações estão relacionadas a vocês. Os resultados do estudo poderão ser publicados em literatura médica, mas as identidades sua e do seu filho(a) não serão reveladas.

Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa: As médicas responsáveis pelo estudo deverão atender a qualquer problema de saúde decorrente do procedimento realizado. Durante todo o procedimento, o paciente e seus pais terão acesso direto aos médicos envolvidos no procedimento (as médicas Claudia Plech Garcia Barbosa e Dra. Cristina Miuki Abe Jacob) através do celular 011-8685 9675 e 011 99891236. Qualquer necessidade de internação no Instituto da Criança será providenciada pelas médicas já citadas. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa: Não há indenização deste procedimento, pois ele faz parte da assistência médica, não sendo experimental. Este procedimento já é utilizado em outros serviços, e será realizado apenas com seu consentimento.

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "TOLERÂNCIA AO LEITE PROCESSADO EM ALTAS TEMPERATURAS EM PACIENTES COM ALERGIA AO LEITE DE VACA MEDIADA PELA IMUNOGLOBULINA E".

Eu discuti com a Dra. Claudia Plech Garcia Barbosa sobre a minha decisão do meu filho(a) para participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo voluntariamente que meu filho(a) participe deste estudo e estou ciente que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que meu filho(a) possa ter adquirido, ou no atendimento dele neste Serviço.

Assinatura do representante legal _____ Data ____/____/____

Assinatura da testemunha _____ Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo, que aplicou o
Consentimento Livre e Esclarecido _____ Data ____/____/____

Anexo C – Receita do *muffin* de chocolate preparado no ICr- HCFMUSP**Utensílios**

Vasilha grande (para misturar os ingredientes)

Batedor de ovos manual

Concha (para despejar os muffins nas forminhas)

Forma de *muffin*

Pincel (para untar com óleo)

Ingredientes

100g de farinha de trigo

85g de açúcar

45g de chocolate em pó (Nestlé®)

1 ovo

35g de óleo vegetal

100g de água

5 g de fermento em pó

6 porções de 8g de leite em pó desnatado (La Sereníssima®)

Modo de preparo

Prep: 10 min | Cozimento: 15 min

Rendimento: 6 unidades

1. Pré-aqueça o forno a 180°C.
2. Unte a forma de muffin com óleo e farinha.
3. Pese os ingredientes (exceto o ovo) em copos descartáveis.
4. Misture a farinha, o açúcar e o chocolate em pó em uma tigela grande.
5. Acrescente o ovo, o óleo e a água e misture até a massa ficar uniforme.
6. Por último, acrescente o fermento e mexa.
7. Despeje a massa sobre a forma de *muffin*, dividindo em 6 partes iguais (deve atingir menos da metade da capacidade da forma).
8. **Em cada massa de *muffin*, acrescente o leite em pó desnatado (8g) e misture bem com uma colher descartável.**
9. **Asse os bolinhos por 15 minutos, a 180°C.**
10. Deixe esfriar, embale os bolinhos individualmente em papel filme. Reserve em temperatura ambiente.

Anexo D – Ficha do protocolo de teste de provocação oral com leite processado a alta temperatura e leite de vaca *in natura*

TESTE DE PROVOCAÇÃO ORAL
LEITE PROCESSADO A ALTA TEMPERATURA

Data do teste: __ / __ / __

DADOS DO PACIENTE

Nome: _____

RG: _____ DN: _____ Sexo: _____

HISTÓRIA CLÍNICA

Idade de início dos sintomas: _____

Sintomas já apresentados: _____

Anafilaxia prévia: ☐ Sim ☐ Não

Reação no último ano: ☐ Sim ☐ Não

Anafilaxia no último ano: ☐ Sim ☐ Não

Come traços de LV sem reação: ☐ Sim ☐ Não

Última reação:

➤ Há quanto tempo:

_____

➤ Qual alimento e forma de preparo:

_____

➤ Intervalo entre a ingestão e o aparecimento dos sintomas:

_____

➤ Tratamento recebido:

_____

Comorbidades: ☐ Rinite ☐ Asma ☐ Outras Alergias _____

☐ Outras patologias _____

História Familiar: ☐ Rinite ☐ Asma ☐ Outras Alergias _____

☐ Outras patologias _____

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

☐ Maior que cinco anos

☐ Diagnóstico atual de ALV IgE mediada

☐ Reação ao LV nos últimos seis meses (se não tiver, provocar com LV após)

☐ Assinatura do TCLE

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- ☐ Gravidez
- ☐ Processo infeccioso agudo
- ☐ Doença crônica em tratamento específico com imunossuppressores
- ☐ Uso de corticoide ou anti-histamínico nos últimos 10 dias
- ☐ Asma descontrolada
- ☐ Dermatite atópica
- ☐ Esofagite eosinofílica
- ☐ Evidências clínicas de alergia a soja, ovo ou trigo
- ☐ Reação a produto com LPAT no último ano

EXAMES LABORATORIAIS

Hemograma (_ / _ / _): _____

IgE total (_ / _ / _): _____

IgE específicas (_ / _ / _): LV _____ α _____ β _____ Caseína _____

Prick Test (_ / _ / _): H _____ SF _____ LV _____ In Nat _____
 α _____ β _____ Caseína _____

QUEIXAS PRÉ-TESTE

EXAME FÍSICO PRÉ TESTE

Peso: _____ Altura: _____

<u>TESTE DE PROVOCAÇÃO COM LPAT (DATA: __ / __ / __)</u>							
Horário	Dose	FC	PA	PF	SaO2	Exame Físico	Queixas
	1/4						
	1/4						
	1/4						
	1/4						

RESULTADO DO TESTE COM LPAT

- ☐ POSITIVO
☐ NEGATIVO

TESTE DE PROVOCAÇÃO COM LV (DATA: __ / __ / __)

Horário	Dose	FC	PA	PF	SaO2	Exame Físico	Queixas
	5 ml						
	10 ml						
	15 ml						
	20 ml						
	25 ml						
	25 ml						
	200 ml						

RESULTADO DO TESTE COM LV

- ☐ POSITIVO
☐ NEGATIVO

ORIENTAÇÃO e CONDUTA

- ☐ Introdução LPAT na dieta
☐ Manter exclusão total de LV

Anexo E – Receita do *muffin* de chocolate orientado ao paciente para consumo domiciliar diário

Utensílios

Vasilha média (para misturar os ingredientes)

Batedor de ovos manual

Concha (para despejar os *muffins* nas forminhas)

Forma para 6 *muffins*

Pincel (para untar com óleo)

Medidor padrão presente nas latas de fórmulas infantis

Ingredientes

1 ovo

1 copo cheio de 200 mL de farinha de trigo

$\frac{3}{4}$ de um copo de 200 mL de açúcar

$\frac{1}{2}$ de um copo de 200 mL de chocolate em pó (Nestlé®)

$\frac{1}{4}$ de um copo de 200 mL de óleo vegetal

$\frac{3}{4}$ de um copo de 200 mL de água

1 colher de chá de fermento em pó

6 porções de (1 medidor padrão) de leite em pó desnatado (La Sereníssima®)

Modo de preparo

Prep: 10 min | Cozimento: 30 min

Rendimento: 6 unidades

1. Pré-aqueça o forno a 180°C.
2. Unte a forma de muffin com óleo e farinha.
3. Separe os ingredientes
4. Misture a farinha, o açúcar e o chocolate em pó em uma tigela grande.
5. Acrescente os ovos, o óleo e a água e misture até a massa ficar uniforme.
6. Por último, acrescente o fermento e mexa.
7. Despeje a massa sobre a forma de muffin, dividindo em 6 partes iguais (deve atingir menos da metade da capacidade da forma).
8. Em cada massa de *muffin*, acrescente o leite em pó desnatado (1 medidor padrão) e misture bem com uma colher.
9. Asse os bolinhos por 30 minutos, a 180°C.
10. Deixe esfriar, embale os bolinhos individualmente em papel filme. Reserve em temperatura ambiente.

8 Referências

---

8 REFERÊNCIAS

Alvaro M, Muraro A. Oral immunotherapy in food allergy: Present and future. *An Pediatr (Barc)*. 2015; 82: 213-5.

Axen R, Drevin H, Kober A, Yman L. A new laboratory diagnostic system applied to allergy testing. *N Engl Reg Allergy Proc*. 1988; 9: 503.

Bartnikas LM, Sheehan WJ, Hoffman EB, Permaul P, Dioun AF, Friedlander J, Baxi SN, Schneider LC, Phipatanakul W. Predicting food challenge outcomes for baked milk: role of specific IgE and skin prick testing. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2012; 109: 309-13.

Beigelman A, Strunk RC, Garbutt JM, Schechtman KB, Jaenicke MW, Stein JS, Bacharier LB. Clinical and laboratory factors associated with negative oral food challenges. *Allergy Asthma Proc* 2012; 33: 467-73.

Bloom KA, Huang FR, Bencharitiwong R, Bardina L, Ross A, Sampson HA, Nowak-Węgrzyn A. Effect of heat treatment on milk and egg proteins allergenicity. *Pediatr Allergy Immunol* 2015; 25: 740-6.

Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1016-8.

Bock SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics* 1987; 79: 683–8.

Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, Plaut M, Cooper SF, Fenton MJ, Arshad SH, Bahna SL, Beck LA, Byrd-Bredbenner C, Camargo CA Jr, Eichenfield L, Furuta GT, Hanifin JM, Jones C, Kraft M, Levy BD, Lieberman P, Luccioli S, McCall KM, Schneider LC, Simon RA, Simons FE, Teach SJ, Yawn BP, Schwaninger JM. 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: S1-58.

Burks AW, Tang M, Sicherer S, Muraro A, Eigenmann PA, Ebisawa M, Fiocchi A, Chiang W, Beyer K, Wood R, Hourihane J, Jones SM, Lack G, Sampson HA. ICON: Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 906-20.

Castro AP, Pastorino AC, Gushken AK, Kokron CM, Filho UD, Jacob CM. Establishing a cut-off for the serum levels of specific IgE to milk and its components for cow's milk allergy: Results from a specific population. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2015; 43: 67-72.

Caubet JC, Nowak-Węgrzyn A, Moshier E, Godbold J, Wang J, Sampson HA. Utility of casein-specific IgE levels in predicting reactivity to baked milk. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 131: 222-4.

Chafen JJ, Newberry SJ, Riedl MA, Bravata DM, Mangione M, Suttorp MJ, Sundaram V, Paige NM, Towfigh A, Hulley BJ, Shekelle PG. Diagnosing and Managing Common Food Allergies: A Systemic Review. *JAMA* 2010; 303: 1848-56.

De Silva IL, Mehr SS, Tey D, Tang ML. Paediatric anaphylaxis: a 5 year retrospective review. *Allergy* 2008; 63: 1071-6.

Dupont C, Chouraqui JP, de Boissieu D, Bocquet A, Bresson JL, Briand A, D'Armaun D, Frelut ML, Ghisolfi J, Girardet JP, Goulet O, Hankard R, Rieu D, Vidailhet M. Dietary treatment of cows' milk protein allergy in childhood: a commentary by the committee on Nutrition of the French Society of Paediatrics. *Br J Nutr*. 2012; 107: 325-38.

Faraj Z, Kim HL. Skin prick testing with extensively heated milk or egg products helps predict the outcome of an oral food challenge: a retrospective analysis. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2012; 8: 5.

Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H, Bahna SL, von Berg A, Beyer K, Bozzola M, Bradsher J, Compalati E, Ebisawa M, Guzman MA, Li H, Heine RG, Keith P, Lack G, Landi M, Martelli A, Rancé F, Sampson H, Stein A, Terracciano L, Vieths S. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21: 1-125.

Ford LS, Bloom KA, Nowak-Węgrzyn AH, Shreffler WG, Masilamani M, Sampson HA. Basophil reactivity, wheal size, and immunoglobulin levels

distinguish degrees of cow's milk tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 180-6.

García-Ara C, Boyano-Martínez T, Díaz-Pena JM, Martín-Muñoz F, Reche-Frutos M, Martín-Esteban M. Specific IgE levels in the diagnosis of immediate hypersensitivity to cows' milk protein in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 185-90.

Goldberg MR, Nachshon L, Appel MY, Elizur A, Levy MB, Eisenberg E, Sampson HA, Katz Y. Efficacy of baked milk oral immunotherapy in baked milk-reactive allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2015.

Gushken AKF, Castro APM, Yonamine GH, Corradi GA, Pastorino AC, Jacob CMA. Double-blind, placebo-controlled food challenges in Brazilian children: Adaptation to clinical practice. *Allergol Immunopathol* 2012; 1: 1-8.

Gushken AKF, Pitarello DLA, Yonamine GH, Ciccone E, Brandão AC, Castro APBM, Pastorino AC, Jacob CMA. Clinical and laboratorial findings from ige mediated cow's milk allergy (CMA) in Brazilian pediatric patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 119: S195.

Host A, Halken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life: clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy* 1990; 45: 587-96.

Huang F, Nowak-Węgrzyn A. Extensively heated milk and egg as oral immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12: 283-92.

Jacob CMA, Oliveira CL, Pastorino AC, Goldberg AC, Okay TS, Fomin ABF, Watanabe LA, Fucci VCZ, Gushken AKF, Doria U, Castro APBM. Is there a specific profile of patients with persistent ige-mediated cow's milk allergy? *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125: AB24.

Jacob CMA, Pastorino AC, Fomin ÂBF, Watanabe LA, Fucci VZ, Gushken AKF, Brandão A, Doria U, Silva CA. Prognostic factors associated to persistent IgE-mediated cow's milk allergy (CMA). *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 23: S179.

Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126: 111-8.

Kattan JD, Cocco RR, Jarvinen KM. Milk and soy allergy. *Pediatr Clin N Am* 2011; 58: 407-26.

Kemp SA, Hill DJ, Allen KJ, Anderson K, Davidson GP, Day AS, Heine RG, Peake JE, Prescott SL, Shugg AW, Sinn JK. Guidelines for the use of infant formulas to treat cows milk protein allergy: an Australian consensus panel opinion. *Med J Aust*. 2008; 188: 109-12.

Kim JS, Nowak-Węgrzyn A, Sicherer SH, Noone S, Moshier EL, Sampson HA. Dietary baked milk accelerates the resolution of cow's milk allergy in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 128: 125-31.

Konstantinou GN, Kim JS. Paradigm shift in the management of milk and egg allergy: baked milk and egg diet. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2012; 32: 151-64.

Leonard SA, Caubet JC, Kim JS, Groetch M, Nowak-Węgrzyn A. Baked milk- and egg-containing diet in the management of milk and egg allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015; 3: 13-23.

Liu AH, Jaramillo R, Sicherer SH, Wood RA, Bock SA, Burks AW, Massing M, Cohn RD, Zeldin DC. National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 798-806.

Luyt D, Ball H, Makwana N, Green MR, Bravin K, Nasser SM, Clark AT. BSACI guideline for the diagnosis and management of cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy*. 2014; 44: 642-72.

Martorell-Aragón A, Echeverría-Zudaire L, Alonso-Lebrero E, Boné-Calvo J, Martín-Muñoz MF, Nevot-Falcó S, Piquer-Gibert M, Valdesoiro-Navarrete L. Position document: IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergol Immunopathol*. 2015; 43: 507-26.

Mehr S, Turner PJ, Joshi P, Wong M, Campbell DE. Safety and clinical predictors of reacting to extensively heated cow's milk challenge in cow's milk-allergic children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014; 113: 425-9.

Miceli Sopo S, Onesimo R, Giorgio V, Fundaro C. Specific oral tolerance induction (SOTI) in pediatric age: clinical research or just routine practice? *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21: 446-9.

Monaci L, Brohée M, Tregoat V, van Hengel A. Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA. *Food Chemistry* 2011; 127: 669-75.

Netting M, Makrides M, Gold M, Quinn P, Penttilä I. Heated allergens and induction of tolerance in food allergic children. *Nutrients* 2013; 5: 2028-46.

Nowak-Węgrzyn A, Bloom KA, Sicherer SH, Shreffler WG, Noone S, Wanich N, Sampson HA. Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 342-7.

Nowak-Węgrzyn A, Fiocchi A. Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009; 9: 234-37.

Nowak-Węgrzyn A, Sampson HA. Future therapies for food allergies. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 558-73.

Pajno GB. Oral desensitization for milk allergy in children: state of the art. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2011; 11: 560-4.

Pepys J. Skin Tests. *Br J Hosp Med*. 1975; 14: 412.

Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF Jr, Bock SA, Branum A, Brown SG, Camargo CA Jr, Cydulka R, Galli SJ, Gidudu J, Gruchalla RS, Harlor AD Jr, Hepner DL, Lewis LM, Lieberman PL, Metcalfe DD, O'Connor R, Muraro A, Rudman A, Schmitt C, Scherrer D, Simons FE, Thomas S, Wood JP, Decker WW. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: Summary report-Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 391-7.

Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 107: 891-6.

Sicherer SH. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 594-602.

Simons Fe, Ebisawa M, Sanchez-Borges M, Thong By, Worm M, Tanno Lk, Lockey Rf, El-Gamal Ym, Brown Sg, Park Hs, Sheikh A. 2015 Update Of The Evidence base: World Allergy Organization Anaphylaxis Guidelines *World Allergy Organ J* 2015; 8: 32.

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

Solé D, Silva LR, Rosario Filho NA, Sarni ROS, Pastorino AC, Jacob CMA, Ferreira CT, de Mello ED, Sarinho ESC, do Prado EA, de Souza FIS, Oliveira FLC, Maranhão HS, Nunes ICC, Pires MMS, Obelar MS, Vieira MC, de Moraes MB, Toporovski MS, Cocco RR, Weffort VRS, Koda YKL. Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2007. *Rev Bras Alerg Immunopatol.* 2008; 31: 64-89.

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.* 2000; 30: 1540-6.

Thomas K, Herouet-Guicheney C, Ladics G, Bannon G, Cockburn A, Crevel R, Fitzpatrick J, Mills C, Privalle L, Vieths S. Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: International workshop report. *Food and Chemical Toxicol.* 2007; 45: 1116-22.

Urisu A, Ando H, Morita Y, Wada E, Yasaki T, Yamada K, Komada K, Torii S, Goto M, Wakamatsu T. Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg White. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 107: 185-90.

Vázquez-Ortiz M, Alvaro-Lozano M, Alsina L, Garcia-Paba MB, Piquer-Gibert M, Giner-Muñoz MT, Lozano J, Domínguez-Sánchez O, Jiménez R, Días M, Martín-Mateos MA, Plaza-Martín AM. Safety and predictors of adverse events during oral immunotherapy for milk allergy: severity of reaction at oral challenge, specific IgE and Prick test. *Clin Exp Allergy.* 2013; 43: 92-102.

Vickery BP, Scurlock AM, Jones SM, Burks AW. Mechanisms of immune tolerance relevant to food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 576-83.

Vila L, Beyer K, Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clinical and Experimental Allergy* 2001; 31: 1599-606.

Wal JM. Bovine milk allergenicity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 93: S2-11.

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

Wood RA. The natural history of food allergy. *Pediatrics* 2003; 111: 1931-7.