

PABLO MICHAEL TORRES CÓRDOVA

Ação da esfingomielina do leite de vaca sobre os linfócitos T

***Natural Killer* Invariantes de pacientes com esofagite**

eosinofílica não sensibilizados ao leite de vaca

São Paulo

2023

PABLO MICHAEL TORRES CÓRDOVA

**Ação da esfingomielina do leite de vaca sobre os linfócitos T
Natural Killer Invariantes de pacientes com esofagite
eosinofílica não sensibilizados ao leite de vaca**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Fabio Fernandes Morato
Castro

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Córdova, Pablo Michael Torres

Ação da esfingomielina do leite de vaca sobre os linfócitos T Natural Killer Invariantes de pacientes com esofagite eosinofílica não sensibilizados ao leite de vaca / Pablo Michael Torres Córdova. -- São Paulo, 2023.

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

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Fabio Fernandes Morato Castro.

Descritores: 1.Esfingomielina 2.Leite de vaca
3.Esofagite eosinofílica 4.Lisofosfolípídeos
5.Células T Natural Killer 6.Pasteurização
7.Citometria de fluxo 8.Células Th2

USP/FM/DBD-273/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Para minha esposa Marcela e minhas filhas Amanda e Samanta, obrigado por me fazer acreditar de novo nas coisas boas da vida

A meus sogros Patricio e Zoila que me apoiam diariamente com muito carinho e me acompanharam nesta etapa importante da minha vida

Para meus professores que sempre acreditaram em mim e depositaram a sua confiança: Prof. Dr. Fabio Morato Castro e Dra. Ariana Campos Yang, vocês fizeram acreditar em mim e sempre me apoiaram como um filho. Sinto muito admiração e respeito por vocês

Para todos os amigos, colegas, colaboradores, funcionários do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e as pessoas maravilhosas que me acompanharam durante esta caminhada no Brasil, muito obrigado, seu apoio foi importante para me fazer sentir em casa para desenvolver todo meu potencial

Para minha querida mãe Elvia que tanto lutou por ver terminado este trabalho, dedico cada palavra desta tese. Eternamente agradecido por ter tido uma mãe maravilhosa, trabalhadora e comprometida ao 100% com a sua família, todas as minhas vitórias são sempre pensando em você.

*“Não é o muito saber que sacia e satisfaz a alma,
mas o sentir e saborear internamente as coisas”*
(São Ignacio de Loyola – Fundador da Companhia de Jesus)
Ad maiorem dei gloriam (A.M.D.G)

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

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

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

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

RESUMO

Córdova PMT. Ação da esfingomielina do leite de vaca sobre os linfócitos T *Natural Killer* Invariantes de pacientes com esofagite eosinofílica não sensibilizados ao leite de vaca [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023

A esofagite eosinofílica (EoE) é uma doença inflamatória crônica imunomediada restrita ao esôfago, caracterizada clinicamente por sintomas de disfunção esofagiana, e histologicamente por inflamação predominante de eosinófilos, 15 ou mais por campo de grande aumento (CGA). Outras causas de eosinofilia sistêmica e local obrigatoriamente devem ser excluídas. É uma doença de mecanismo imunológico misto (com participação ou não de IgE) com predomínio de inflamação do perfil T *Helper* tipo 2 (Th2), em resposta à exposição a alérgenos alimentares, principalmente o leite de vaca, e aeroalérgenos, sendo mais frequente em pacientes com a alergia a Proteína do Leite de Vaca (APLV) com participação de IgE. As células T *Natural Killer* Invariante (iNKT) são uma subpopulação de linfócitos T da imunidade inata que reconhecem antígenos glicolipídicos através da união com o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC – tipo 1) relacionado à proteína CD1d. Estas células iNKT têm como estímulo específico a glicoproteína Alfa-Galactosilceramida (α -GalCer). Da mesma forma que a α -GalCer estimula as células iNKT, existe a hipótese de que o leite de vaca também o faça, através de um glicolipídio denominado esfingomielina (SM), levando ao aumento da produção de citocinas do perfil Th1 e Th2, e conseqüentemente à inflamação eosinofílica no esôfago. A literatura científica mundial tem mostrado que uma dieta de exclusão empírica do leite de vaca, nos pacientes com EoE, melhora de forma significativa o quadro clínico e o infiltrado eosinofílico do esôfago. Portanto, nosso estudo, de forma original, procura avaliar a ação da esfingomielina presente no leite de vaca, sobre as células iNKT e suas subpopulações, de um grupo de pacientes com EoE que não apresentam APLV nem sensibilização IgE às proteínas do leite da vaca. Para isso, estudaremos o papel da SM sobre as células iNKT por meio de testes de linfoproliferação no sangue periférico e no tecido esofagiano com diferentes estímulos (tipos de leite).

Palavras-chave: Esfingomielina. Leite de vaca. Esofagite eosinofílica.

Lisofosfolipídeos. Células T matadoras naturais. Pasteurização. Citometria de fluxo. Células Th2.

ABSTRACT

Córdova PMT. Cow's milk sphingomyelin action on Invariant Natural Killer T cells of not sensitized to cow's milk eosinophilic esophagitis (EoE) patients [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Eosinophilic esophagitis (EoE) is a chronic inflammatory immune-mediated disease restricted to the esophagus, clinically characterized by esophageal dysfunction symptoms, and histologically by eosinophil-predominant inflammation of 15 or more eosinophils per high power field (HPF), other systemic and local causes of esophageal eosinophilia should be excluded. It is a disease with a mixed immunological mechanism (IgE and non-IgE mediated) with dominant T helper type 2 (TH2) inflammation, as a response to aeroallergens and food allergens exposure, especially cow's milk, and being more frequent in patients with IgE mediated cow's milk protein allergy (CMPA). These Invariant Natural Killer T cells are a T lymphocyte subpopulation of innate immunity that recognizes glycolipid antigens through the union of the major histocompatibility complex (MHC- Type 1) related to CD1d protein. These iNKT cells have a specific stimulus, a glycoprotein called as Alpha – Galactosylceramide (α – GalCer). The same way that α -GalCer stimulates iNKT cells, exists the hypothesis that cow's milk also does it, through a glycolipid called as sphingomyelin (SM), leading to increase of Th1 and Th2 cytokines production, and consequently to the esophagus eosinophilic inflammation. The global scientific literature has shown that cow's milk empiric elimination diet, in EoE patients, significantly improves symptoms and eosinophilic infiltrates of the esophagus. Therefore, our study, in an original way, seek to evaluate cow's milk sphingomyelin role, on iNKT cells and their subpopulations, in a group of EoE patients that have neither CMPA nor IgE sensitization to cow's milk proteins. For that reason, we will study the SM role on iNKT cells through lymphoproliferation tests in the peripheral blood and esophageal tissue with different stimulus (Types of Milk).

Keywords: Sphingomyelins. Milk. Eosinophilic esophagitis. Lysophospholipids. Natural Killer T-cells. Pasteurization. Flow cytometry. Th2 cells.

LISTA DE SIGLAS

APLV	Alergia à Proteína do Leite de Vaca
CGA	Campo de Grande Aumento
DRGE	Doença do Refluxo Gastroesofágico
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
EoE	Esofagite Eosinofílica
IBP	Inibidor de Bomba de Prótons
IgE	Imunoglobulina E
LV	Leite de Vaca
iNKT	Linfócitos T <i>Natural Killer</i> Invariantes
α -Galcer	Alphagalactosilceramida
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
DMSO	Dimetil-sulfóxido
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
ml	Mililitro
μ L	Microlitro
NK	<i>Natural Killer</i>
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
TCR	Receptor de célula T
IL	Interleucina
SFED	<i>Six Food Elimination Diet</i>
SM	Esfingomielina
TSLP	Linfopoetina Tímica Estromal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	ESOFAGITE EOSINOFÍLICA.....	15
1.1.1	GENERALIDADES.....	15
1.1.2	FISIOPATOLOGIA.....	16
1.1.3	RELAÇÃO COM O LEITE DE VACA.....	24
1.2	LINFÓCITOS T <i>NATURAL KILLER</i> INVARIANTES (INKT).....	26
1.3	LIPÍDIOS DO LEITE: ESFINGOMIELINA E LISOFOSFATIDILCOLINA 28	
1.3.1	ESFINGOMIELINA DO LEITE DE VACA.....	29
1.3.2	LISOFOSFATIDILCOLINA DO LEITE DE VACA.....	30
1.4	LEITE DE VACA PASTEURIZADA VS LEITE UHT.....	33
1.5	LINFÓCITOS T <i>NATURAL KILLER</i> INVARIANTES E LEITE DE VACA 34	
2	OBJETIVOS.....	36
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	CASUÍSTICA	37
3.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	37
3.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	38
3.4	DELINEAMENTO DO ESTUDO	40
3.5	SELEÇÃO DE PACIENTES E LOGÍSTICA	41
3.6	AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	42

3.7	COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO PARA EXAMES LABORATORIAIS	43
3.8	TESTE CUTÂNEO DE LEITURA IMEDIATA “PRICK TEST” ESTRATOS DO LEITE DE VACA.....	43
3.9	IGE E IGG4 ESPECÍFICA SÉRICA PARA LEITE DE VACA E FRAÇÕES	44
3.10	ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA E ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO	45
3.11	AVALIAÇÃO DE SCORES ENDOCOPICOS E HISTOLOGICOS SCORE DE REFERENCIA ENDOSCOPIA DE ESOFAGITE EOSINOFILICA.....	46
3.12	SISTEMA DE SCORE HISTOLOGICO DE ESOFAGITE EOSINOFILICA	48
3.13	SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO ...	49
3.14	TESTE PILOTO PARA PADRONIZAÇÃO DA DOSE DOS ESTÍMULOS E DOSAGEM DE CITOCINAS	49
3.15	CULTURA DE LINFÓCITOS	51
3.16	IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	52
3.17	PROTOCOLO DE DIGESTÃO DE TECIDOS ESOFÁGICOS	54
3.18	DIFICULDADES DO PROCESSAMENTO DO TECIDO ESOFÁGICO 55	
3.19	LUMINEX.....	56
4	RESULTADOS.....	57
4.1	CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES	57
4.2	PERFIL DE SENSIBILIZAÇÃO IGE E IGG4 PARA LEITE DE VACA..	59
4.3	SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E TECIDO ESOFAGIANO	61

4.4	EOEHSS: SISTEMA DE ESCORE HISTOLÓGICO PARA ESOFAGITE EOSINOFILICA	63
4.5	EFERS: ESCORE DE REFERENCIA ENDOSCÓPICA DA ESOFAGITE EOSINOFÍLICA	65
4.6	RESULTADOS DOS TESTES PARA PADRONIZAÇÃO DA DOSE DOS ESTÍMULOS E DOSAGEM DE CITOCINAS	66
4.7	CULTURA DE CÉLULAS COM DIFERENTES ESTÍMULOS EM AMOSTRAS DE PBMC CONGELADAS	67
4.8	DOSAGEM DE CITOCINAS A PARTIR DE ESTÍMULO COM OS DIFERENTES LIPÍDEOS	71
4.9	CULTURA DE CÉLULAS COM DIFERENTES ESTÍMULOS EM AMOSTRAS DE PBMC FRESCAS	14
5	DISCUSSÃO	14
6	CONCLUSÕES	20
7	ASPECTOS ÉTICOS	22
8	ANEXOS	24
9	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A incidência de alergias alimentares tem aumentado de forma preocupante em todo o mundo, entretanto, da mesma forma o estudo e entendimento de seus mecanismos fisiopatológicos têm melhorado consideravelmente ao longo da última década. Tem sido caracterizada uma gama expressiva de diferentes manifestações clínicas e alterações laboratoriais, associadas à raça – etnia e geografia, assim como, com a história natural e tipos de alimentos. As alergias alimentares podem evoluir para a resolução clínica espontânea (tolerância imunológica) ou para a persistência da doença. O leite é a causa mais relacionada com alergia alimentar na infância, com prevalência superior a 2,5%, quando todas as reações são incluídas, independentemente da participação de IgE (1–4). Dentre as comorbidades relacionadas, a dermatite atópica grave e a esofagite eosinofílica podem produzir complicações crônicas e irreversíveis se não tratadas adequadamente. A esofagite eosinofílica (EoE) é uma doença crônica inflamatória caracterizada pelo acúmulo de eosinófilos na mucosa esofágica que, desde sua descrição há mais de 20 anos, vem ganhando grande importância por sua íntima relação com a alergia alimentar, por sua predisposição genética e pela inflamação eosinofílica associada a complicações crônicas como, por exemplo, remodelamento do epitélio esofágico e ruptura do esôfago. A esofagite eosinofílica tem sido descrita como uma entidade com mecanismo imunológico misto, com participação ou não de IgE. As avaliações clínicas e laboratoriais dos quadros com participação de IgE são amplamente utilizadas para o diagnóstico etiológico na prática clínica diária, porém isto só é válido em 20% dos pacientes (5,6). O tratamento baseado na indução de

tolerância oral, da alergia alimentar com participação de IgE, tem eficácia de aproximadamente 80%. Entretanto, nos pacientes com esofagite eosinofílica como comorbidade, não tem sido observada uma resposta satisfatória com esse tratamento, inclusive existem descrições que a indução de tolerância oral poderia induzir ou predispor a esofagite eosinofílica. É importante ressaltar que a esofagite eosinofílica não é somente uma entidade IgE mediada, pois possui diversas outras células do sistema imunológico com papéis fundamentais em sua patogenia (7). Os métodos diagnósticos utilizados de rotina para os pacientes com esofagite eosinofílica com quadros sem a participação de IgE têm mostrado baixa especificidade e sensibilidade, deixando o especialista sem possibilidades para um correto diagnóstico e tratamento. Existem dúvidas na literatura mundial sobre a participação do linfócito T *Natural Killer* Invariantes (iNKT) na alergia alimentar associada à esofagite eosinofílica. A Esofagite Eosinofílica é uma doença inflamatória crônica do esôfago com infiltração de eosinófilos na mucosa e com alterações fisiológicas e anatômicas importantes, frequentemente relacionada com antígenos alimentares, e que tem aumentado sua prevalência nos últimos anos de forma surpreendente, chegando a ser similar à doença de Crohn (1/10000) (8). Na EoE existe um subgrupo de pacientes que, mesmo não sendo alérgicos a proteínas do leite de vaca (APLV) ou estando apenas sensibilizados a essas proteínas, apresentam piora do quadro clínico e do infiltrado eosinofílico da doença quando ingerem leite de vaca e seus derivados. Alergia a proteína do leite de vaca (APLV) é a alergia alimentar mais comum entre lactentes e crianças. O leite de vaca, um alimento rico em nutrientes, apresenta em sua composição um esfingolípido denominado esfingomielina (SM), que também pode ser encontrado na maioria das

membranas plasmáticas das células animais. Por outro lado, as células T *Natural Killer* invariante (iNKT) que são uma subpopulação de linfócitos T da imunidade inata que reconhecem antígenos glicolipídicos (esfingomielina) por meio da união com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC – tipo 1) relacionado a proteína CD1d. Alguns autores têm observado e sugerem que a esfingomielina do leite de vaca poderia levar ao desenvolvimento de EoE, promovendo a proliferação das células iNKT, o que acarretaria uma maior produção de citocinas do perfil Th2 que, por sua vez, facilitaria a inflamação eosinofílica no esôfago. Estas células iNKT (V α 24 x V β 11) utilizam como estímulo específico a Alfa – Galactosilceramida (α -GalCer), sendo bem característico desta célula. No tratamento existem três tipos de dietas que são utilizadas para a EoE: 1. Dieta elementar, 2. Dieta alérgenos-específica, 3. Dieta de exclusão dos seis alimentos mais relacionados com EoE (leite – trigo – ovo – nozes – soja – frutos de mar). A dieta elementar, composta de aminoácidos, carboidratos básicos e triglicerídeos de cadeia meia, livre de alérgenos é a dieta que tem apresentado os melhores resultados, com eficácia acima de 90%, com resolução dos sintomas e da normalização dos achados microscópicos de 4 a 6 semanas, porém o custo e a necessidade de administração via enteral são os principais limitantes (9). A dieta de exclusão dos 6 alimentos tem mostrado uma eficácia de aproximadamente 72%, mas que também, por motivos óbvios, é de difícil execução (9). Por fim, no caso da dieta alérgeno específica, dentre todas as dietas, é a que apresenta o pior resultado, com eficácia de 45.5% (9). A dieta alérgeno específica, que é a dirigida por testes cutâneos (*Prick to Prick e Patch test*), tem apresentado valores preditivos negativos de 92% (10). É importante lembrar que quando combinamos esta dieta que é dirigida por testes cutâneos

acrescida da eliminação empírica do leite , conseguimos melhorar as taxas de sucesso de forma considerável (11). Um estudo feito em humanos demonstrou que as células *natural killer* invariantes (iNKT) estão presentes em valores elevados no esôfago, mas diminuídos no sangue periférico dos pacientes pediátricos com esofagite eosinofílica, e demonstrou também que as células iNKT proliferam na presença do esfingolipídio do leite (12). Essas observações poderiam sugerir outros potenciais mecanismo de ativação e propagação da inflamação eosinofílica (1,12).

1.1 ESOFAGITE EOSINOFÍLICA

1.1.1 GENERALIDADES

Desde as primeiras descrições da doença no ano 1993, a definição da EoE tem apresentado várias mudanças importantes, começando desde o primeiro Guia Internacional publicado no ano 2007 e seguindo com sua atualização em 2011. Hoje, a esofagite eosinofílica é definida como uma doença inflamatória crônica restrita ao esôfago mediada por mecanismos imunológicos, caracterizada clinicamente por sintomas de disfunção esofágica e histologicamente por inflamação de predomínio eosinofílico, sendo que outras causas locais e sistêmicas de eosinofilia esofágica devem ser excluídas. As manifestações clínicas e patológicas não devem ser interpretadas de forma isolada (8).

Atualmente o diagnóstico desta entidade, vem aumentando, com uma prevalência em crianças e adultos de aproximadamente 0,4% nos países do ocidente (13). É uma das doenças do aparelho digestivo mais comuns, quando investigamos problemas de alimentação nas crianças e quando avaliamos a

disfagia e impactação alimentar nos adultos (14). Atualmente é considerada a primeira causa de disfagia e impactação alimentar em crianças, adolescentes e adultos jovens, e a segunda causa mais prevalente de sintomas esofágicos crônicos ou recorrentes podendo acometer todas as faixas etárias (crianças e idosos) (8).

1.1.2 FISIOPATOLOGIA

A fisiopatologia da esofagite eosinofílica é complexa e desafiadora, existem muitos fatores que podem estimular e perpetuar a inflamação eosinofílica esofágica. A esofagite eosinofílica é uma doença imunológica com participação de antígenos alimentares e aeroalérgenos, que apresenta um perfil inflamatório de predomínio Th2, com mecanismo imunológico misto (IgE e Linfócito T) (15,16). Como outras doenças imunomediadas de mecanismo misto, a esofagite eosinofílica também pode apresentar várias alterações genéticas associadas, e estas alterações têm sido descritas através dos estudos genéticos de associação genômica (GWAS) (17). Dentre as principais temos as alterações no gene da Calpaina 14 (CAPN14) que está encarregado da reparação e homeostases epitelial, temos também alterações no gene do transdutor de sinais e ativador da transcrição 6 (STAT6) responsável da responsividade da IL-13 e por último e não menos importantes alterações no gene de codifica a Linfopietina Tímica estromal (TSLP) que é um potente estimulador da resposta imune Th2 (18,19). Devido a todas estas alterações genéticas, existem mudanças importante no sistema imunológico levando a perpetuação da inflamação eosinofílica esofágica e alterações na integridade da barreira epitelial esofágica. Somente o fato de apresentar alterações genéticas associadas, não

explica por si só a história natural da doença, existem outros fatores que devem ser avaliados e que são importantes para a compreender dos mecanismos associados a inflamação eosinofílica. Dentre eles, temos alterações que vão ligadas uma à outra como: alterações genéticas, fatores ambientais e alterações de barreira esofágica (20). Esta interação pode ser vista quando lembramos os principais dados epidemiológicos da EoE como, por exemplo, o fato de que a maioria dos pacientes com EoE são caucasianos em quase todos os trabalhos, com uma relação de 3:1 a favor do sexo masculino. Essa característica se produz por uma variante genética no gene que codifica a proteína fator 2 similares ao receptor de citocina (CRLF2) a qual codifica o receptor da Linfopoiétina Tímica Estromal (TSLP) que está localizada no cromossomo X e Y (21).

A barreira epitelial do esôfago está protegida pela camada mucosa esofágica, que quando é quebrada pode favorecer a entrada de antígenos externos, conseqüentemente com uma maior apresentação ao sistema imune e favorecendo, desta forma, as sensibilizações (22). Recentemente foi visto que existe perda da diferenciação do epitélio esofágico na EoE, já que aproximadamente o 40% dos genes que regulavam a integridade da barreira epitelial estavam pouco funcionantes, por conseguinte, funções como queratinização e diferenciação da barreira epitelial estavam afetadas (23).

Como foi dito no parágrafo anterior a função de barreira na EoE está alterada, e, devido a isto, agentes externos podem induzir direta e indiretamente inflamação no epitélio esofágico, lembrando que o epitélio é uma fonte de citocinas e mediadores lipídicos que levam a inflamação. As células epiteliais esofágicas dos pacientes com EoE podem estimular a produção de citocinas e fatores quimiotáticos (RANTES, CXCL16, eotaxina-3, TSLP e IL-33) de várias

células do sistema imune como linfócitos T, eosinófilos, basófilos, INKT, as quais produzem mediadores inflamatórios com um perfil de interleucinas Th2 levando a hiperplasia e disfunção da barreira epitelial esofágica, transição mesenquimal do epitélio e finalmente a fibroses e dismotilidade característica da EoE (24,25,26). Devemos levar em consideração todos estes fatores anteriormente mencionados para entender que estamos frente a uma doença multifatorial, que se caracteriza por inflamação esofágica decorrente de estímulos ambientais externos (aeroalérgenos – alimentos) e internos (microbioma), com características genéticas já descritas.

As células T *Natural Killer* invariante (iNKT) são uma subpopulação de linfócitos T da imunidade inata que tem também uma função na fisiopatologia da esofagite eosinofílica. Os pacientes com EoE apresentam redução das iNKT no sangue periférico e aumento das iNKT no esôfago comparados com os controles saudáveis, e foi visto que nos pacientes com EoE ativa têm maior expansão clonal das iNKT levando a uma maior produção de IL-13 em resposta ao estímulo, comparado com o grupo controle (24).

A interleucina 4 conhecida por produzir a mudança do perfil Th0 em Th2 e ativar a mudança de classe dos linfócitos B para a produção de IgE, na EoE tem sido visto um aumento da produção desta citocina como das células relacionadas a ela (27).

A interleucina 5 conhecida por regular a expansão, sobrevivência, migração e apoptoses de eosinófilos, na EoE tem sido visto que a sua expressão está diretamente relacionada ao grau de eosinofilia, porém estudos com anti-IL5 só tem conseguido melhorar a eosinofilia esofágica, mas não os sintomas (28,29).

A interleucina 13 é uma das citocinas mais importantes na patogênese da doença, tem sido visto que esta citocina consegue recrutar eosinófilos estimulando a produção de eotaxina-3 que é uma quimiocina que atrai eosinófilos, assim também agindo sobre os fibroblastos a produzir periostina a qual aumenta essa quimiotaxia de eosinófilos. Esta é produzida pelos linfócitos Th2 e eosinófilos ativados na EoE e já foi visto em trabalhos que está altamente presente nos esôfagos dos pacientes com esofagite eosinofílica (30).

A IgG4 conhecida por ser um anticorpo bloqueador que se liga ao receptor de IgG com limitada capacidade de ligar-se a receptores de reatividade cruzada, segundo alguns autores tem mostrado ser importante na patogênese da EoE. Alguns autores relatam que poderia tratar-se de uma doença relacionada a IgG4, já que frequentemente estas doenças estão associadas com processos de remodelamento tecidual associada a eosinófilos, ainda sem comprovação científica adequada (31,32). Estudos têm demonstrado que os pacientes com EoE têm valores de IgG4 anormalmente elevados e que no esôfago dos pacientes com EoE existem 45 vezes mais IgG4 comparados com pacientes controles, assim também que os pacientes com EoE tem valores elevados de IgG4 específica para os alimentos mais relacionados a piora da EoE como são o leite, ovo, trigo e castanhas (33,34).

O RANTES/CCL5 é uma quimiocina que é um velho conhecido por facilitar o estabelecimento de um microambiente Th2 (35 e 36). Usando as células epiteliais isoladas de pacientes sem EoE e com EoE (paciente pediátricos) foi observado aumento importante do RANTES diante estimulação com poli (1:37) (que é agonista do TRL3) em crianças com EoE. Estes dados sugerem que as

células epiteliais esofágicas são uma fonte de expressão de Quimiocinas. Sendo que CCR3, CCR4 e CCR5 se ligam a RANTES. (37)

Curiosamente, mesmo que o CCR5 seja considerado o receptor primário de ligação ao CCL5, em alguns subtipos de células, como mastócitos, é responsável pela quimiotaxia mediada por CCL5. Não se conhece qual receptor é o mais importante para a quimiotaxia induzida por RANTES nas iNKTs.

Existem poucos receptores de quimiocinas observados nas iNKTs do sangue periférico, isto poderia ser pelo recrutamento esofágico de células que expressam o receptor ou pode ser devido a que o CCR se internalizou devido à sua ativação quando o ligante está presente. Tomados em conjunto estes resultados, sugerem que o RANTES de origem epitelial pode contribuir para o recrutamento da iNKT no local da inflamação eosinofílica. (37)

Outros trabalhos também sugerem que a Quimiocina CCL5 (RANTES) esta aumentada nas biopsias dos pacientes com EoE e poderiam contribuir a quimiotaxia de eosinófilos e linfócitos para o epitélio esofágico (37)

Sendo que a CCL5 é uma citocina que é conhecida por contribuir com várias doenças atópicas e doenças inflamatórias Eosinofílicas como EoE, a CCL5 (antes conhecida como RANTES) está regulada pelo EMSY que poderia ser um alvo interessante para inibir TSLP e CCL5. Este artigo sustenta que a expressão deste gene EMSY pode diminuir a expressão do TSLP e CCL5 sem mudanças na expressão de IL-33 e CAPN14. Podendo ter relevância clínica interessante: já que neste trabalho feito in-vivo o EMSY está significativamente aumentado em EoE em atividade (38)

A função de barreira na EoE está alterada, devido a isto agentes externos podem induzir inflamação no epitélio esofágico, lembrando que o epitélio é uma

fonte de citocinas e mediadores lipídicos que levam a inflamação. As células epiteliais esofágicas dos pacientes com EoE podem estimular a produção de citocinas e fatores quimiotáticos (RANTES, CXCL16, eotaxina-3, TSLP e IL-33) de várias células do sistema imune como linfócitos T, eosinófilos, basófilos, INKT, as quais produzem mediadores inflamatórios com um perfil de interleucinas Th2 levando a hiperplasia e disfunção da barreira epitelial esofágica, transição mesenquimal do epitélio e finalmente a fibroses e dismotilidade característica da EoE. (39,40,41)

A fisiopatologia da esofagite eosinofílica é complexa, novos trabalhos são necessários para esclarecer conceitos atuais sobre a função de várias células e moléculas do sistema imune e a sua relação com os fatores ambientais e genéticos. A continuação colocaremos a Figura 1 com um resumo da fisiopatologia da EoE.

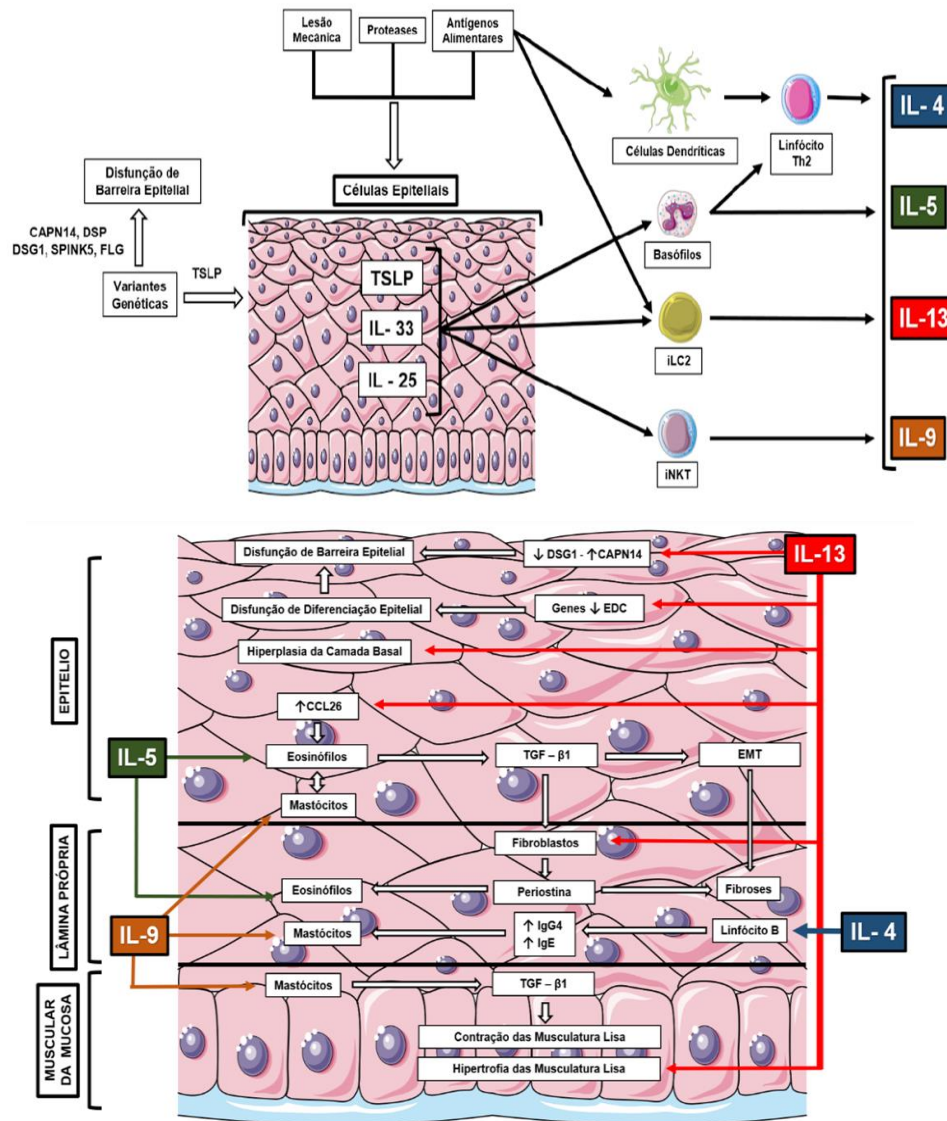


FIGURA 1: INTERAÇÕES ENTRE ALTERAÇÕES GENÉTICAS, DE BARREIRA E IMUNOLÓGICAS NA ESOFAGITE EOSINOFÍLICA

A. O epitélio esofágico na EoE pode apresentar defeitos intrínsecos na função de barreira devido a polimorfismo genéticos específicos, respostas a danos mecânicos ou fatores ambientais como proteases e antígenos alimentares, levando a produção de citocinas como TSLP, IL-33 e IL-25. Estas citocinas atingem várias células presentes no epitélio esofágico, incluindo células dendríticas, basófilos, iLC2 e iNKT, seja para promover a produção de citocina do tipo 2 ou influenciar estas células para o desenvolvimento dos linfócitos Th2. Estes leucócitos produzem citocinas tipo 2 incluindo IL-4, IL-5, IL-13 e IL-19, as quais estão aumentadas na mucosa esofágica de pacientes com EoE ativa. **B.** Localmente existe níveis aumentados de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 que atingem várias estruturas e células do sistema imune da mucosa esofágica para influenciar nos mecanismos envolvidos na patogenia da EoE. Este esquema resume o impacto destas citocinas nas células epiteliais, fibroblastos, musculatura lisa e na infiltração de leucócitos no esôfago. IL-13 é suficiente para mudar a expressão genica epitelial, incluindo indução do CCL26 e CAPN14, diminuição da DSG1 e dos genes do complexo de diferenciação epidérmica (EDC). Adicionalmente IL-13 induz produção de periostina dos fibroblastos e estimula a hipertrofia da musculatura lisa. IL-5 e IL-9 promovem a supervivência e ativação dos eosinófilos e mastócitos respectivamente, no tecido esofágico. Ambas as células agem como fontes de TGF-β1 em diferentes regiões da mucosa esofágica; TGF-β1 promove a transição epitélio-mesenquimal (EMT) e contração da musculatura lisa. IL-4 age diretamente na mudança de classe de imunoglobulina do linfócito B para IgE e IgG4, as quais estão elevadas localmente na EoE. Existe evidência sugerindo que estas citocinas tipo 2 em grande parte promovem fenótipos clínicos, histológicos e moleculares associadas a EoE, incluindo hiperplasia, disfunção da diferenciação das células epiteliais, disfunção da função de barreira do epitélio, fibrose subepitelial e dismotilidade esofágica. (EoE: Esofagite Eosinofílica, TSLP: linfopoietina estromal tímica, IL: interleucina, iLC2: células linfoides inatas tipo 2, iNKT: linfócito T *natural killer* invariante, Th2: linfócito T Helper 2, CAPN14: calpaina-14, DSP: desmoplaquina, DSG1: desmogleína-1, SPINK5: inibidor de serinopeptidase do tipo Kazal 5, FLG: Filagrina, EDC: complexo de diferenciação epidérmica, CCL26 (eotaxina-3): proteína Quimioatraente de eosinófilos, TGF-β1: fator de transformação do crescimento beta 1, EMT: transição epitélio-mesenquimal, IgE: imunoglobulina E, IgG4: imunoglobulina G subtipo 4). FONTE: Modificado do Caldwell JM, Paul M, Rothenberg ME. Novel immunologic mechanisms in eosinophilic esophagitis. *Curr Opin Immunol.* 2017;48:114-121. doi:10.1016/j.coi.2017.08.006.

Quando lemos o conceito de esofagite eosinofílica encontramos que é uma entidade clínico – patológica, que precisa destes dois parâmetros presentes para considerar que o paciente tem a doença. Sintomas de disfunção esofágica devem estar presentes e estes não são capazes de predizer remissão histológica ou endoscópica na EoE (42). Os sintomas podem apresentar-se em todas as faixas etárias, não sendo específicos de uma idade específica. Atualmente se considera que a primeira causa de disfagia e impactação alimentar em crianças, adolescentes e adultos jovens é a EoE, sendo estes sintomas os mais prevalentes e sempre que presentes devem ser investigados. Também podemos falar que é a segunda causa mais prevalente de sintomas esofágicos crônicos ou recorrentes dependendo da população estudada. De forma didática podemos falar que os sintomas mais comuns nas crianças são: vômitos e dor abdominal, engasgos, recusa alimentar, atraso do crescimento, o ato de demorar muito tempo nas refeições e tosse durante alimentação assim como também são importantes os sintomas tipo refluxo gastroesofágico (43). É muito importante lembrar que existem sinais de disfagia progressiva aos alimentos sólidos, que podem ser o único sinal de sintomatologia de disfunção esofágica; também são chamados mecanismos de compensação e estes sintomas podem ir desde a ingestão excessiva de líquidos durante as refeições, mastigação excessiva e cortar os alimentos em pequenos pedaços. Nos adolescentes e adultos jovens os sintomas mais frequentemente relatados são: impactação alimentar (46–63%) disfagia para alimentos sólidos (15–23%), dor torácica não cardiogênica (não associada a deglutição), dor torácica após exercício físico e sintomas tipo refluxo gastroesofágico (0.8 – 9%) (43).

1.1.3 RELAÇÃO COM O LEITE DE VACA

Como já comentamos anteriormente, a esofagite eosinofílica é uma doença inflamatória crônica do esôfago muito relacionada com antígenos alimentares. *Spergel* e colaboradores (2012) conseguiram identificar os alimentos como causa em 319 pacientes com EoE, sendo os mais comuns: leite, ovo, trigo e soja. Existe uma clara correlação entre o aparecimento de esofagite eosinofílica após imunoterapia oral com alimentos (OIT), fato que foi demonstrado em 12 estudos com diversos alimentos (44). O alimento mais investigado foi o leite em 193 pacientes, dentre eles 38 pacientes faziam o protocolo *Baked Milk* (Leite cozido), e aproximadamente o 2,7% dos pacientes desenvolveram EoE após a imunoterapia oral com alimentos (44). Quase seguindo a mesma linha, *Sampson* e colaboradores (2011) avaliaram se uma dieta com leite processado (leite cozido) acelerava a resolução da alergia a proteína do leite de vaca nas crianças, concluindo que a tolerância ao leite processado na dieta dos pacientes poderia ser um marcador de uma APLV transitória, sendo este grupo o que desenvolvia de forma mais rápida tolerância ao leite puro comparado com os pacientes que estavam em restrição absoluta do leite. Neste mesmo estudo, dois pacientes homens (3,1%) desenvolveram esofagite eosinofílica. Um deles apresentava sintomas com os alimentos com leite cozido e encontrava-se já em estrita exclusão do leite no momento do diagnóstico, o outro paciente desenvolveu EoE após passar a provocação com leite puro (45). Nosso grupo publicou recentemente um trabalho com 89 pacientes com alergia a proteína do leite de vaca com participação de IgE anafiláticos e observou alta prevalência de esofagite eosinofílica (n:10/89 – 11,23%) (46). Há um grande debate na literatura mundial sobre a existência da

relação entre alergia alimentar e esofagite eosinofílica. Podemos começar comentando que a prevalência de EoE em pacientes com alergia alimentar IgE mediada é do 4.7% (47) e como ressaltado anteriormente existiria um pequeno risco de desenvolver EoE após imunoterapia oral para alimentos, com dados recentes de metanálise mostrando que 2.7% dos pacientes que fizeram ITO desenvolvem EoE após 2.4 anos de ter sido reintroduzido o alimento em sua dieta (44).

A dieta alérgeno específica, que é a dirigida por testes cutâneos (*Prick to Prick e Patch test*), ou séricos (IgE sérica específica) tem apresentado valores preditivos negativos de 92% (9). Por outro lado, fato bastante interessante e que motivou nosso estudo, é que quando combinamos esta dieta com a eliminação empírica do leite, conseguimos melhorar as taxas de sucesso de forma considerável (10). Um estudo feito em humanos tem demonstrado que as células *natural killer* invariantes (iNKT) estão presentes em valores elevados no esôfago, mas diminuídos no sangue periférico dos pacientes pediátricos com esofagite eosinofílica, demonstrou que as células iNKT proliferam na presença do esfingolípido do leite, este fato explicaria um potencial mecanismo pelo qual poderia iniciar-se e propagar-se a inflamação eosinofílica (12,24). Estas observações poderiam ajudar a entender como a exclusão empírica do leite leva à melhora do infiltrado eosinofílico e, conseqüentemente, o quadro clínico dos pacientes com esofagite eosinofílica. Atualmente não é recomendada a dieta dirigida por testes cutâneos de alergia em adultos e crianças com EoE.

1.2 LINFÓCITOS T *NATURAL KILLER* INVARIANTES (iNKT)

É importante lembrar que o sistema imune gera diferentes populações de linfócitos T, com receptores variáveis, que facilitam o desenvolvimento de resposta específicas adaptativas frente a uma grande variedade de agentes patógenos. Os linfócitos T classicamente reconhecem antígenos peptídeos apresentados pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) tipo I e II. Existem também subpopulações de linfócitos T que podem ser ativadas por antígenos lipídicos que são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos chamada CD1. Estas moléculas CD1 são um tipo de MHC de classe I não clássicos que tem a capacidade de se unir com um amplo repertório de lipídios derivados de patógenos e tecidos dos hospedeiros para ser apresentados ao linfócito T. Esta grande família de proteínas CD1 humanas estão modificadas por cinco genes (A, -B, -C, -D, -E), sendo o tipo CD1d o mais importante para nosso estudo (48). Até o dia de hoje têm sido descritos vários ligantes da proteína CD1d de diversas fontes, com capacidade de ativar e inibir as células T. Estas células são as chamadas células T *Natural Killer* ou NKTs, elas constituem uma linhagem de linfócitos T com propriedades especiais, sendo uma característica importante a expressão de receptores típicos de células NK:

NK1.1 (CD161) em humanos. Existem três subtipos de células NKT (49,50): NKTs de Tipo I ou Invariantes (iNKT): possuem um TCR com receptores V α 24-J α 18 e V β 11 em humanos que são específicos da proteína CD1d. NKTs de Tipo II ou não variantes: possuem um repertório mais amplo no TCR que respondem da mesma forma aos antígenos lipídicos apresentados por CD1d. NKTs de Tipo III: possuem um TCR diverso e não são restritas pela proteína CD1d.

Dentre os ligantes de CD1d descritos estão os exógenos e endógenos. Dos exógenos tem sido descrito a α -Galactosilceramida (α -Galcer) que é um glicolípido extraído da esponja marina *Agelas mauritanus* com a capacidade de estimular células iNKT estimulando a produção de citocinas Th1 e Th2 através da proteína CD1d. As células T *Natural Killer* invariante (iNKT) são uma subpopulação de linfócitos T da imunidade inata que reconhecem antígenos glicolipídicos através da união com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC – tipo 1) relacionado a proteína CD1d (51). Estas células se ativam durante diferentes doenças infecciosas e inflamatórias contribuindo ao desenvolvimento da resposta imune adaptativa (52–55). Vários tipos de células NKT têm sido descritas, mas a maioria são as células NKT tipo 1 ou chamadas de invariantes (iNKT), que expressam o receptor da célula T (TCR) com a cadeia alfa do TCR semivariante e as cadeias beta do TCR. Este TCR reconhece antígenos lipídicos ou glicolipídicos que se ligam ao MHC tipo 1 relacionado à proteína CD1d, a qual está expressa pelas células apresentadoras de antígenos (APC) e outros tipos de células como os hepatócitos. As iNKT expressam marcadores de superfície como CD161, CD4 e constitutivamente expressam marcadores de ativação como CD25, CD69 e HLA-DR.

Células NKT1 produzem IFN- γ e baixas quantidades de IL-4 rapidamente após estimulação, e expressam o marcador de células NK, CD161 (também chamado de NK1.1 em camundongos), enquanto células NKT2 e NKT17 possuem um perfil CD161-. As células NKT2 e NKT17 produzem rapidamente e em grande quantidade, respectivamente, IL-4 e IL-17 após estimulação(56,57) (Tabela 1).

Além disso, em humanos as células iNKT podem ser categorizadas como CD4+, CD4-CD8- (duplo negativo – DN) e uma pequena porcentagem como CD8+. As células com o fenótipo DN tendem a um perfil de resposta Th1, enquanto células CD4+ tendem a um perfil Th2, embora também sejam capazes de secretar citocinas do tipo Th1. Células NKT1 estão presentes nas frações CD4+ e DN, enquanto as células NKT2 estão presentes principalmente na fração CD4+(58)

Tabela 1. Tipos de células iNKT e suas principais características. Fonte: (59)⁷

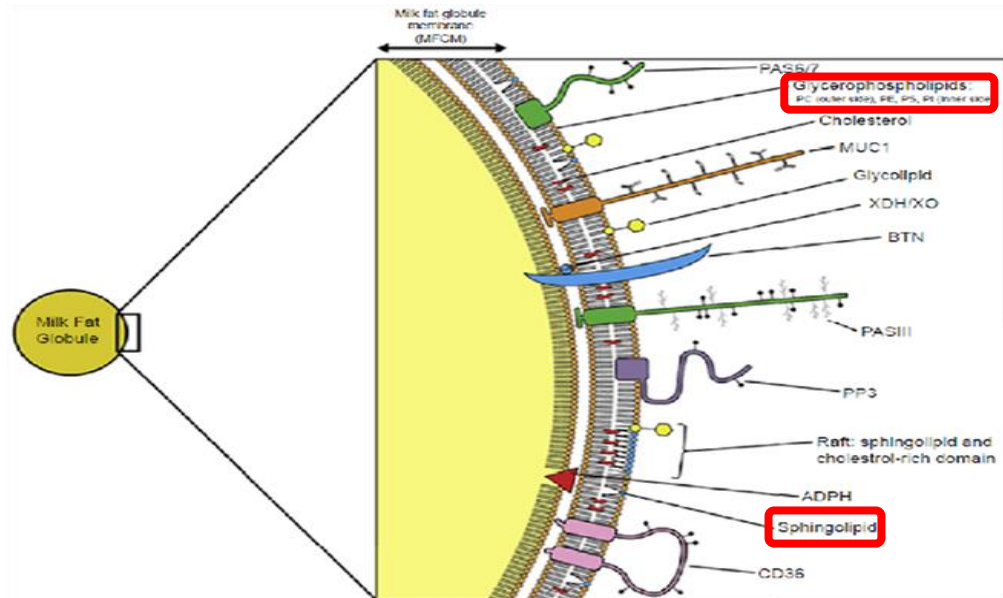
Tipos de iNKT	Subpopulações	Marcador de NK	Citocinas
NKT1	CD4+/ CD4- CD8- (DN)	CD161+	↑IFN- γ ; ↓IL-4
NKT2	CD4+	CD161-	↑IL-4
NKT17	CD4-	CD161-	↑IL-17

1.3 LÍPIDIOS DO LEITE: ESFINGOMIELINA E

LISOFSOFATIDILCOLINA

Estes dois tipos de lipídios fazem parte da membrana do glóbulo de gordura do leite (MFGM) como visto na figura 2.

Figura 2: Distribuição de fosfolipídios e proteínas que constituem o MFG



Fonte: Elias, Laubscher, and Jiménez-Flores (2013). [A color version of this figure is available online at www.booksite.elsevier.com/9780124046108]. Gallier S et al. Food Structures, Digestion and Health. Elsevier Inc (2014)

1.3.1 ESFINGOMIELINA DO LEITE DE VACA

Os esfingolípídios são a segunda maior classe de lipídeos de membranas em animais e vegetais, sendo as ceramidas as moléculas mais simples deste grupo. Estas ceramidas são as precursoras das esfingomielinas e glicoesfingolípídeos. A esfingomielina é encontrada na maioria das membranas plasmáticas das células animais e como o nome sugere, encontra-se em grande quantidade na bainha de mielina que reveste os axônios em alguns neurônios. (60). A relação entre o esfingolípido do leite de vaca e as células iNKT vem devido às citocinas Th2 serem secretadas após ligação dos receptores das células iNKT com o esfingolípido do leite. Estes esfingolípídios são

apresentados vias molécula CD1d na superfície das células iNKT, tem sido observada a relação do esfingolipídio do leite de vaca com a ativação das células iNKT em crianças com alergia ao leite de vaca IgE mediada para a produção de citocinas Th2. Um estudo feito em crianças com esofagite eosinofílica avaliou o papel das células iNKT e o esfingolipídio do leite nessa patologia. Os resultados mostraram que as crianças com EoE ativa apresentaram menos células iNKT periféricas com uma resposta TH2 maior contra o alfa – galactosilceramida (α -GaCer) e ao esfingolipídio do leite, comparado com as crianças com EoE controlada e ao grupo controle saudável. Os autores concluíram que o esfingolipídio do leite era capaz de ativar as células iNKT do sangue periférico nas crianças com EoE ativa produzindo citocinas do perfil Th2, também observaram que as células iNKT estavam mais aumentadas no sítio da inflamação eosinofílica (24). As observações feitas sobre a melhora da inflamação eosinofílica nos pacientes com esofagite eosinofílica após restrição empírica do leite, a presença de células iNKT nos pacientes com esofagite eosinofílica e a relação dos esfingolipídios do leite de vaca com a proliferação das células iNKT, despertam interesse único para entender de fato o potencial mecanismo de como o leite de vaca poderia propagar a inflamação esofagiana (61, 62).

1.3.2 LISOFOSFATIDILCOLINA DO LEITE DE VACA

Tem sido descrito que alguns lipídeos poderiam agir como verdadeiros alérgenos, como inicialmente foi descrito que os paciente alérgicos tinham testes

positivos séricos e cutâneos para avaliação de IgE específica contra fosfolípidios isolados do pólen do cipres. (63)

A Lisofosfatidilcolina (LPC ou Lyso-PC) é o mais abundante lisofosfolípido, mas presente no sangue periférico do ser humano, o nível do LPC no plasma poderia estar entre os 150 – 500 uM em pacientes saudáveis. Estes lipídeos têm a capacidade de ser apresentados as células NKT, ainda não existem dados na literatura sobre este lisofosfolípido em pacientes com esofagite eosinofílica, porém sabe-se que a LPC junto com a esfingomielina são capazes de estimular tanto células NKT1 como NKT2.(64)

Existem algumas propostas relacionadas a como os lipídeos poderiam influenciar no desenvolvimento de uma resposta Alérgica Th2 (Figura 3).

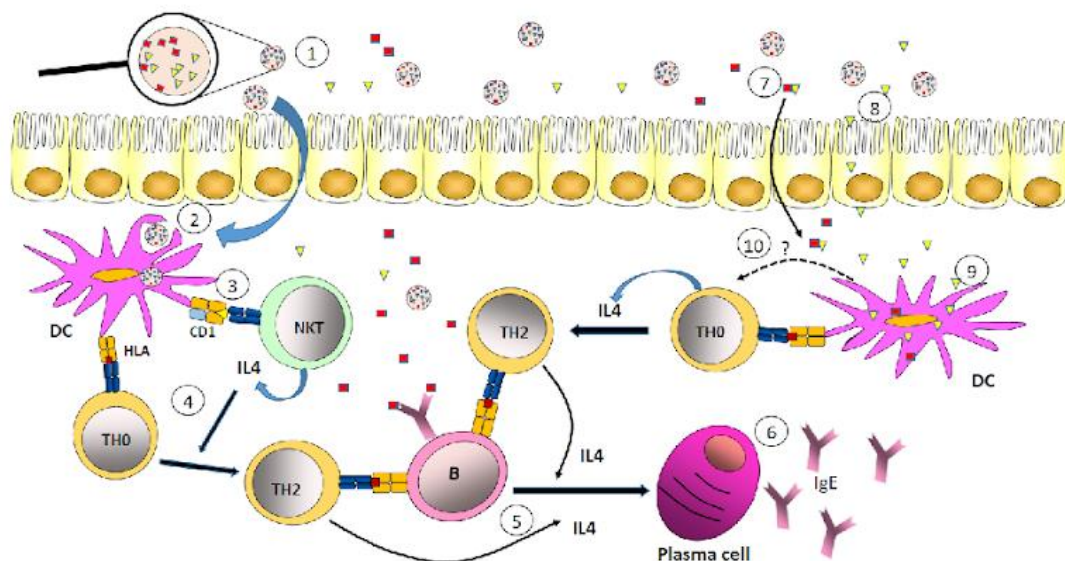


FIGURA 3: Modelo de como os Lipídeos poderiam influenciar na resposta alérgica: Partículas (1) (pólen, pelos de animais, alimentos etc.) contendo peptídeos (quadrados vermelhos) alérgenos e lipídios (triângulos amarelos) podem ser internalizados por DCs (2). Essas células apresentam lipídios (3) para células NKT ou outros linfócitos T CD1 restritos, que liberam citocinas (4) como IL4, que por sua vez promovem a diferenciação de linfócitos Th0 em células Th2 (4) que reconhecem peptídeos antigênicos através de moléculas HLA classe II. Posteriormente, as células Th2 promovem a ativação de células B (5) para se desenvolverem em plasmócitos produtores de IgE (6). Por outro lado, os lipídeos em diferentes formas, por exemplo ligados a proteínas transportadoras de lipídeos (7), PALMS (mediadores de lipídeos associados ao pólen), etc. podem influenciar a relação entre alérgenos peptídicos e uma variedade de tipos de células, incluindo células epiteliais respiratórias ou intestinais (8) ou células apresentadoras de antígenos (9), que, por mecanismo ainda indefinido (10), podem facilitar o desenvolvimento de respostas do tipo Th2. **Fonte: Del Moral, M. G., & Martínez-Naves, E. (2017). The Role of Lipids in Development of Allergic Responses. Immune network, 17(3), 133–143.**

Existem diferenças de consumo do tipo de leite de vaca ao redor do mundo, e uma questão importante a ser destacada é que o leite mais consumido no Brasil é o UHT, enquanto nos Estados Unidos e Europa, onde foi relatada a prevalência bem mais baixa de EoE, o leite mais consumido é pasteurizado (65). Em um contexto geral, enquanto a venda de leite pasteurizado caiu 25% de 1990-1993, as vendas de leite UHT (*Ultra-high Temperature Milk*) cresceram 415% de 1991-1995, tornando o leite UHT o mais consumido no Brasil. Isso aconteceu já que os consumidores de leite pasteurizado estavam insatisfeitos com o produto, principalmente pelo prazo de validade de 1 dia, má qualidade microbiológica (condições inadequadas de higiene de ordenha, transporte e refrigeração) e pela má qualidade da embalagem. Embora estes problemas tenham sido contornados na atualidade o custo e prazo de validade mais curtos ainda são questões que mantêm o leite UHT no topo do ranking, sendo o mais consumido em nosso país (65).

Partindo da premissa que o leite UHT poderia estar contribuindo para essas taxas aumentadas de EoE observadas em nosso país foram feitas algumas análises para se comparar os leites diferentemente processados. Uma delas foi uma análise de lipidoma de leites UHT e pasteurizado feito pela nossa equipe de pesquisa da FMUSP, ainda sem dados publicados, na qual detectamos que o lipídeo lisofosfatidilcolina (Lyso-PC) apresenta uma expressão dez vezes maior nos leites UHT do que nos leites pasteurizados. Sabe-se que esse lipídeo se liga às células T natural killer invariáveis, estimulando-as (66).

1.4 LEITE DE VACA PASTEURIZADA VS LEITE UHT

A pasteurização e ultrapasteurização são processos calor projetados para matar bactérias (germes) no leite que podem ser prejudiciais e/ou podem causar deterioração de produtos lácteos. O leite das fazendas é transportado para fábricas de processamento de laticínios e geralmente é processado termicamente alguns dias após a ordenha para evitar a deterioração e prolongar sua vida útil. As principais diferenças entre os leites pasteurizados e ultrapasteurizados são a intensidade do tratamento térmico e o método de embalagem, que influenciam a vida útil antecipada e as datas de validade. No processo de pasteurização do leite algumas bactérias sobrevivem, na maioria das vezes em números muito baixos, embora não sejam consideradas prejudiciais e geralmente não estraguem o leite em condições e tempos normais de refrigeração.

No leite chamado UHT por suas siglas em inglês que significa tratamento de ultra calor ou processamento de temperatura ultra alta, o leite passou por um processo de aquecimento em temperaturas muito altas por mais tempo do normalmente usado para conseguir ser muito mais letal para as bactérias, matando praticamente todas as preocupações do leite. Colocaremos as principais diferenças na tabela 2.

Tabela 2. Comparação dos diferentes tipos de processamento do Leite de Vaca

PARÂMETROS	PASTEURIZADA	ULTRA – PASTEURIZADA	ASSÉPTICA (UHT)
TEMPERATURA	72 °C – 15 segundos	138 °C – 2 segundos	138 °C – 2 segundos
BACTÉRIAS	Algumas sobrevivem	Quase estéril	Quase estéril
RE-CONTAMINAÇÃO	Possível	Minimizado	Minimizado
MATERIAIS	Desinfetado/exposto	Esterilizado/fechado	Esterilizado/fechado
EMBALAGEM	Papel/plástico	Papel/plástico	Vedação hermética
TRATAMENTO DA EMBALAGEM	Não Tratado	Tratado com H2O2	Esterilizado
ARMAZENAMENTO	Refrigerado	Refrigerado	Estável na prateleira
VALIDADE	10 – 21 dias	30 – 90 dias	> 6 meses

Fonte: <https://cals.cornell.edu/sites/default/files/202304/pasteurization-fact-sheet-v1.pdf>

1.5 LINFÓCITOS T *NATURAL KILLER* INVARIANTES E LEITE DE VACA

A função dos linfócitos pode ser avaliada *in vitro* por estimulação antigênica ou ativadores policlonais. As citocinas Th2 são secretadas pela ligação dos receptores de iNKT com os esfingolipídios do leite (SLs), estes esfingolipídios são apresentados via molécula CD1d na superfície das células iNKT. Segundo *Jyonouchi* e colaboradores (2013), que analisaram o PBMCs de 10 crianças com esofagite eosinofílica ativa, 10 crianças com EoE controlada e 16 pacientes controles saudáveis *in vivo* e depois incubado com alfa – galactosilceramida (α -GalCer) e esfingolipídio do leite. Os autores observaram que as crianças com EoE ativa tinham menos células iNKT estimuladas com α -GalCer e SLs no sangue periférico e níveis aumentados de células iNKT nas biopsias de esôfago com uma maior resposta Th2 quando comparados com as crianças com as células iNKT das crianças com EoE controlada e do grupo controle. Estes achados sugerem que o esfingolipídio do leite poderia levar ao

desenvolvimento de EoE, promovendo a proliferação das células iNKT, o que levaria a uma maior produção de citocinas do perfil Th2 que facilitaria a inflamação eosinofílica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar a resposta ao estímulo com leite de vaca das células iNKT do sangue periférico e de biopsia de tecido do esôfago, em pacientes com Esofagite Eosinofílica não sensibilizados ao leite de vaca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1: Avaliar a resposta das células iNKT diante do estímulo com leite de vaca UHT integral em pacientes com EoE não sensibilizados ao leite de vaca.

Objetivo específico 2: Avaliar a resposta das células iNKT diante do estímulo com leite de vaca desnatado em pacientes com EoE não sensibilizados ao leite de vaca.

Objetivo específico 3: Avaliar a resposta das células iNKT diante do estímulo com leite de vaca pasteurizado integral em pacientes com EoE não sensibilizados ao leite de vaca.

Objetivo específico 4: Avaliar a resposta das células iNKT diante do estímulo com esfingomielina do leite de vaca em pacientes com EoE não sensibilizados ao leite de vaca.

Objetivo específico 5: Avaliar a resposta das células iNKT diante do estímulo com um Lisofosfatidilcolina (LPC) do leite de vaca em pacientes com EoE não sensibilizados ao leite de vaca.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Este trabalho foi desenhado como um estudo prospectivo, com a participação voluntária dos sujeitos da pesquisa. Existem atualmente matriculados em nosso Ambulatório de Esofagite Eosinofílica do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), 110 pacientes previamente cadastrados, já com diagnóstico confirmado de esofagite eosinofílica, e novos casos aparecem semanalmente. O grupo de estudo foi composto no total por 30 pacientes. Sendo o primeiro grupo de estudo composto por 16 pacientes com Esofagite Eosinofílica (EoE) sem sensibilização IgE específica para o leite de vaca e frações. Outro grupo de 4 pacientes com APLV IgE mediada, sendo que 2 deles apresentam EoE e APLV IgE mediada concomitante e 2 apresentam somente APLV IgE mediada e um grupo controle de 10 pacientes saudáveis. Este estudo já foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de nossa Instituição (Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa – CAPPesq – Registro: 15232).

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Diagnóstico confirmado de esofagite eosinofílica.
- Pacientes sem sensibilização IgE para o leite de vaca e frações, excetuando os pacientes com APLV IgE mediada
- Pacientes sem tratamento dietético nem medicamentoso para EoE nas últimas 12 semanas, excetuando os pacientes com APLV IgE mediada que fazem restrição do leite de vaca

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes com outras causas de eosinofilia esofagiana
- Pacientes com imunodeficiências primárias
- Pacientes com doenças infecciosas
- Pacientes com doenças autoimunes e neoplasias
- Pacientes com cirurgia de esôfago há menos de 6 meses
- Imunoterapia alérgeno específica
- Gravidez
- Analfabetismo
- Ausência do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)
- Sensibilização IgE específica para leite de vaca e frações, excetuando os pacientes com APLV IgE mediada
- Pacientes que estiveram fazendo uso de corticoide sistêmico

GRUPO DE ESTUDO 1 – Pacientes com Esofagite Eosinofílica

- Pacientes com EoE sem APLV IgE mediada
- Pacientes com EoE avaliados com história clínica, endoscopia digestiva alta e estudo anatomopatológico
- Pacientes sem intolerância ao leite de vaca
- Pacientes sem outra alergia alimentar conhecida

GRUPO DE ESTUDO 2 – Pacientes com APLV IgE mediada sem EoE:

- Pacientes com APLV IgE mediada
- Pacientes sem EoE avaliados com história clínica e endoscopia digestiva alta e estudo anatomopatológico

- Pacientes sem intolerância ao leite de vaca
- Pacientes sem outra alergia alimentar conhecida

GRUPO DE ESTUDO 3 – Pacientes com APLV IgE mediada e com EoE:

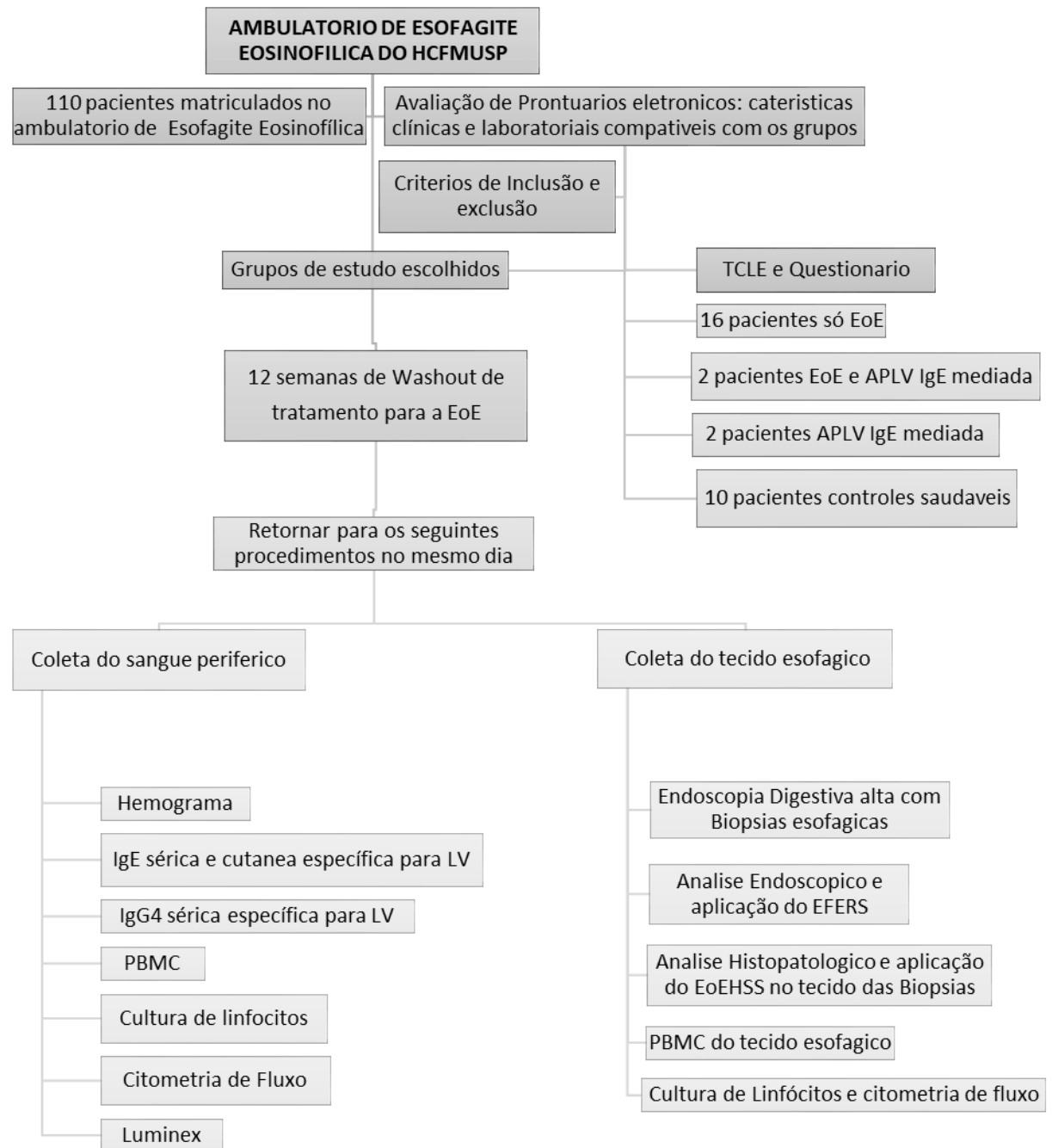
- Pacientes com APLV IgE mediada e EoE concomitante
- Pacientes sem intolerância ao leite de vaca
- Pacientes sem outra alergia alimentar conhecida

GRUPO CONTROLE

- Pacientes com indicação de endoscopia digestiva alta por outras patologias
- Pacientes sem EoE avaliados com história clínica e endoscopia digestiva alta e estudo anatomopatológico
- Pacientes sem intolerância ao leite de vaca
- Pacientes sem sensibilização IgE ao leite de vaca
- Pacientes sem outra alergia alimentar conhecida
- Pacientes atópicos (Rinite Alérgica – Asma – Dermatite Atópica)

Todos os participantes do estudo serão esclarecidos quanto à natureza e finalidade do trabalho e convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO



3.5 SELEÇÃO DE PACIENTES E LOGÍSTICA

De todos os pacientes pré-selecionados para o estudo foram realizadas as análises dos prontuários eletrônicos dos pacientes através do sistema *Prontmed* (utilizado no HCFMUSP), análise dos critérios de inclusão e exclusão para a primeira seleção dos pacientes. Posteriormente foi feita uma entrevista pessoal para explicar ao paciente sobre este trabalho de pesquisa, vantagens, desvantagens e objetivos do trabalho. Uma vez que eles aceitaram participar, os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE) e foi preenchido um questionário padrão criado para este trabalho de pesquisa para atualização de dados demográficos, clínicos e laboratoriais (veja nos anexos). Imediatamente foi realizado nesse mesmo dia testes cutâneos de leitura imediata Prick Test com extratos padronizados de leite de vaca e frações (caseína, alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina) (*FDA Allergenic*) e a coleta do sangue periférico para avaliação laboratorial e exames de triagem necessários, assim como a pesquisa sérica de IgE específica e IgG4 específica do leite de vaca e frações (caseína, alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina) pelo método ImmunoCap (Thermofisher, Brasil).

Após esta primeira etapa de triagem os pacientes continuaram para a primeira fase de coletas das amostras do sangue e tecido esofágico. Previamente foi orientado aos pacientes deixarem de usar qualquer tratamento para controle da EoE durante 12 semanas, período que chamamos de *Washout*, excluindo a restrição do leite de vaca em pacientes com APLV IgE mediada. Após este período marcamos um retorno no ambulatório, para confirmar que foram feitas as orientações dadas anteriormente e para a coleta do Sangue e tecido esofágicos frescos nesse mesmo dia dos pacientes selecionados.

Coletamos o sangue periférico dos pacientes e imediatamente estas amostras foram levadas ao LIM-60 para realização da correspondente separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP). Imediatamente após a coleta do sangue periférico, o paciente foi levado ao setor de Endoscopia Digestiva alta (EDA) do mesmo complexo hospitalar, para a realização de uma EDA com biopsias seriadas do esôfago, com o objetivo de obter tecido esofágico fresco para a separação do CMSP do esôfago dos pacientes, que também foi levado ao LIM-60 para seu processamento e correto armazenagem, pensando na posterior cultura de linfócitos y Citometria de fluxo.

3.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Foram avaliados na revisão de prontuários eletrônicos e na entrevista pessoal com questionário alguns dados importantes como sexo, idade, idade de início dos sintomas, idade do diagnóstico, idade do início do tratamento, tempo em anos entre início e diagnóstico, quadro clínico clássico e mecanismos de compensação, sensibilização IgE para aeroalérgenos, sensibilização IgE para alimentos, concomitância com outras doenças atópicas como: rinite alérgica, asma, dermatite atópica e alergia alimentar IgE mediada, historia de anafilaxias clássicas e de anafilaxias tardias, alergia alimentar múltipla, remissão profunda, se o diagnóstico foi feito antes, durante ou depois de algum protocolo de dessensibilização ou imunoterapia oral a alimentos, historia familiar de EoE e outras comorbidades, tratamento atual do paciente, características macroscópicas e microscópicas do esôfago dos pacientes.

3.7 COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO PARA EXAMES LABORATORIAIS

Foi coletado sangue por acesso venoso periférico (10 - 20 ml por paciente) para avaliação de hemograma completo com eosinofilia periférica, IgE sérica total e os anticorpos IgE específicos e IgG4 específicos no soro para leite de vaca total e para as frações do leite (caseína, alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina). O sangue periférico foi coletado no mesmo dia que as amostras do tecido esofagiano.

3.8 TESTE CUTÂNEO DE LEITURA IMEDIATA “PRICK TEST” ESTRATOS DO LEITE DE VACA

Tínhamos orientado ao paciente a suspender o uso de anti-histamínicos 7 dias antes do teste assim como antidepressivos tricíclicos que tenham potente atividade anti-H1 e anti-H2, corticoides via oral em doses moderadas e altas e potentes corticoides tópicos. Realizamos o teste com extratos de leite de vaca padronizados, assim como o controle positivo que será histamina e o controle negativo que será solução salina (*FDA Allergenic*). Serão realizados na face volar do antebraço dos pacientes em duplicata, usando lancetas de *Osterbale* (uma lanceta por cada antígeno) em um ângulo de 90° fazendo leve pressão através da gota durante 5 segundos. Imediatamente depois os braços serão enxutos com papel toalha. Aguardaremos 15 minutos para realizar a leitura dos braços, medindo os diâmetros das pápulas, fazendo uma média entre o diâmetro maior e seu respectivo diâmetro ortogonal. Serão positivas as pápulas iguais ou maiores de 3 milímetros, subtraindo o tamanho da pápula do controle negativo.

3.9 IgE E IgG4 ESPECÍFICA SÉRICA PARA LEITE DE VACA E FRAÇÕES

Será realizada para avaliar sensibilização aos alérgenos em estudo, no caso as proteínas do leite de vaca. Para a determinação sérica de IgE específica utilizaremos o sistema ImmunoCAP100® (Thermofisher, Brasil). Este sistema trabalha com a técnica do fluoroenzimaimunoensaio que tem como alvo o alérgeno suspeito, este alérgeno encontra-se acoplado por ligação covalente ao polímero (fase sólida ImmunoCAP). O alérgeno reage com os anticorpos IgE específicos que estão na amostra do soro do paciente. Uma lavagem é feita para eliminar os anticorpos não específicos ao alérgeno, depois adiciona-se um conjugado de anticorpos anti-IgE ligados à β – galactosidade (β – Gal) e depois de incubar esta amostra, os anticorpos não ligados ao alérgeno são lavados novamente. Uma vez lavada a amostra, adicionamos o substrato da enzima contido na substância desenvolvedora ou reveladora, e aguardamos um tempo de incubação, em seguida adicionamos uma solução de bloqueio para deter a reação e fazemos a medida da fluorescência do eluato. A quantidade de auto – anticorpos específicos da amostra serão diretamente proporcionais ao valor de fluorescência. Os resultados serão quantitativos em kU/L, sendo que são agrupados em intervalos de níveis de IgE correspondente as classes de 0 a 6. Em relação a IgG4 específica para leite de vaca e frações, não possuem valores de referência, sendo considerados como positivos valores acima de 0.1 mg/l até 30 mg/l. A determinação sérica de IgE específica e IgG4 específica foi realizada para os seguintes alérgenos: Leite de vaca total e suas frações (alfa-lactoalbumina, beta-lactoglobulina e caseína).

3.10 ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA E ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO

A endoscopia digestiva alta foi realizada sem o uso prévio contínuo de medicações que possam alterar seu resultado histológico, tais como corticoides sistêmicos e deglutidos, nem dietas de exclusão alimentar, excetuando os pacientes com APLV IgE mediada. O exame foi realizado sempre pela mesma equipe de médicos endoscopistas experientes na área do Serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas, parceria científica com o Dr. Tomás Navarro. Para a realização do exame o paciente foi monitorizado com oxímetro de pulso, cardioscópio e capnógrafo e um acesso venoso foi estabelecido. Foi realizada sedação endovenosa de acordo com a idade e/ou condições clínicas do paciente, por médico anestesiológico. Oxigênio suplementar foi utilizado em todos os pacientes durante a realização do exame; o tipo e dosagem das medicações serão individualizadas para cada paciente. O exame foi realizado com o paciente em decúbito lateral esquerdo, com videoendoscópio de 9,8 mm (EG 580 WR, Fujinon). Foram analisadas, fotografadas e descritas as características endoscópicas comuns na Esofagite Eosinofílica tais como: estrias, sulcos longitudinais, acúmulos de fibrina, traqueízação, friabilidade da mucosa, subestenoses e/ou lacerações. Em média, foram coletadas 4 a 6 biópsias de esôfago proximal e distal, podendo exceder em número, a depender de critério médico, sendo os fragmentos de mucosa colocados em frascos separados com formol a 10% (2 a 3 fragmentos de esôfago distal e 2 a 3 fragmentos de esôfago proximal). Os frascos foram corretamente identificados e enviados para exame anatomopatológico subsequente. Foram observadas alterações histológicas associadas tais como: presença de Eosinofilia

esofagiana, microabscessos eosinofílicos, grânulos eosinofílicos extracelulares, hiperplasia celular basal, dilatação de espaços intercelulares e fibrose de lâmina própria. Para exclusão diagnóstica de outras patologias gastrointestinais, foi realizada biópsia de antro gástrico e primeira porção de duodeno na primeira endoscopia com pesquisa de eosinófilos. Dos 4 – 5 fragmentos coletados nas biopsias do esôfago, 3 fragmentos foram cedidos para nosso protocolo de pesquisa e os restantes seguiram a rotina para o futuro laudo anatomopatológico da EDA com biopsias do paciente.

3.11 AVALIAÇÃO DE SCORES ENDOCOPICOS E HISTOLOGICOS

SCORE DE REFERENCIA ENDOSCOPIA DE ESOFAGITE

EOSINOFILICA

Para uma melhor avaliação dos pacientes, foi realizada o Escore de Referência Endoscópica para Esofagite Eosinofílica (E.F.E.R.S.) que avalia alguns achados endoscópicos importantes: Edema, Anéis, Exsudatos, estrias longitudinais e estenose esofagite. Este escore procura padronizar os achados endoscópicos e melhorar a acurácia diagnóstica, não sendo exclusivos ou patognomônicos de EoE, já que 10% dos pacientes apresentam esôfagos de aparência normal. (68, 69) Na seguinte tabela 3 estão descritas as características do EFERS:

Tabela 3. Proposta de sistema de classificação para avaliação endoscópica das características esofágicas da esofagite eosinofílica.

Características principais:	
☐	<p>Anéis fixos (também chamados de anéis concêntricos, esôfago corrugado, anéis corrugados, anel esofágico, traquealização)</p> <ul style="list-style-type: none"> – Grau 0: nenhum – Grau 1: leve (sulcos circunferenciais sutis) – Grau 2: moderado (anéis distintos que não prejudicam a passagem de um endoscópio adulto para diagnóstico padrão (diâmetro externo 8-9,5 mm)) – Grau 3: grave (anéis distintos que não permitem a passagem de um endoscópio para diagnóstico)
☐	<p>Exsudatos (também chamados de manchas brancas, placas)</p> <ul style="list-style-type: none"> – Grau 0: nenhum – Grau 1: leve (lesões envolvendo <10% da área esofágica da superfície) – Grau 2: grave (lesões envolvendo >10% da área esofágica)
☐	<p>Sulcos (também chamados de linhas verticais, sulcos longitudinais)</p> <ul style="list-style-type: none"> – Grau 0: ausente – Grau 1: leve (linhas verticais presentes sem profundidade visível) – Grau 2: grave (linhas verticais com profundidade na mucosa (reco))
☐	<p>Edema (também conhecido como padrão vascular baixo, mucosa pálida)</p> <ul style="list-style-type: none"> – Grau 0: ausente (presença de vascularidade distinta) – Grau 1: leve (perda de clareza das marcações vasculares) – Grau 2: grave (ausência de marcações vasculares)
☐	<p>Estenose</p> <ul style="list-style-type: none"> – Grau 0: ausente – Grau 1: presente
Características secundárias:	
☐	<p>Esôfago em "papel crepom" (fragilidade da mucosa ou laceração na passagem do endoscópio de diagnóstico, mas não na dilatação pós-esofágica)</p> <ul style="list-style-type: none"> – Grau 0: ausente – Grau 1: presente

Fonte: Alfredo J. Lucendo, Ángel Arias, Javier Molina-Infante & Laura Arias-González (2017) The role of endoscopy in eosinophilic esophagitis: from diagnosis to therapy, Expert Review of Gastroenterology & Hepatology, 11:12, 1135-1149, DOI: [10.1080/17474124.2017.1367664](https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1367664).

3.12 SISTEMA DE ESCORE HISTOLOGICO DE ESOFAGITE EOSINOFILICA

O critério histológico para o diagnóstico de EoE, de forma geral, baseia-se na presença de ≥ 15 eosinófilos por campo de grande aumento (CGA), não se considerando outras alterações histológicas. O escore histológico EoEHSS é uma medida mais completa para se avaliar as biópsias esofágicas, pois considera 8 características: inflamação eosinofílica, hiperplasia da camada basal, abscessos eosinofílicos, eosinófilos lineares presentes na camada superficial do epitélio, espaços intercelulares, alteração tintorial do epitélio superficial, células epiteliais disceratóticas e espessamento da lâmina basal. O grau e extensão destas alterações são avaliados numa escala de 0 a 3 pontos sendo 0: normal e 3: alteração máxima. Em resumo, trata-se de um método de avaliação das mudanças histológicas em pacientes com esofagite eosinofílica que pode ser útil para individualizar as características de cada paciente, correlacionar com sinais e sintomas das doenças, o que ajuda nas decisões terapêuticas para os pacientes. Alguns autores relatam que esta ferramenta poderia ser útil para predizer o estágio de tratamento do paciente. Atualmente podemos confirmar a utilidade dessa ferramenta para avaliar atividade histológica da doença, sendo possível correlacionar essa atividade com outros escores relacionados a EoE como Escores de Qualidade de Vida, Endoscópico e de Sintomas. Pode ser útil ainda para prever o remodelamento com o desenvolvimento de fibroses. (70)

3.13 Separação de células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) foram obtidas através de separação por gradiente, utilizando solução de Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Life Sciences)²⁸.

O sangue coletado em tubos ACD foi diluído 1:1 com Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS). Em seguida o sangue diluído foi colocado sobre Ficoll-Paque (volume será definido a partir da quantidade de sangue diluído de cada paciente). Transcorridos 40 minutos de centrifugação à 2300 rpm, as PBMCs localizadas na interface entre o Ficoll-Paque e o plasma diluído foram transferidas para um tubo e lavadas com 10mL de HBSS por 10 minutos à 1700 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas e tratadas com ACK (tampão de lise) para a eliminação de hemácias. Após 2 minutos foi adicionado 10mL de HBSS para neutralizar a reação de lise e ocorreu uma nova centrifugação por 10 minutos à 1700 rpm. O sobrenadante foi descartado e o botão celular ressuspensado em 3 ml de HBSS para contagem e viabilidade celular com Trypan Blue em câmara de Neubauer. Após uma última centrifugação de 10 minutos a 1700 rpm, as células foram congeladas em uma solução contendo soro fetal bovino e DMSO 10% e mantidas em nitrogênio líquido até o momento da cultura celular

3.14 TESTE PILOTO PARA PADRONIZAÇÃO DA DOSE DOS ESTÍMULOS E DOSAGEM DE CITOCINAS

Realizamos três testes pilotos com células de indivíduo controle saudável, com diferentes dosagens de estímulo em cultura, para avaliar a viabilidade das

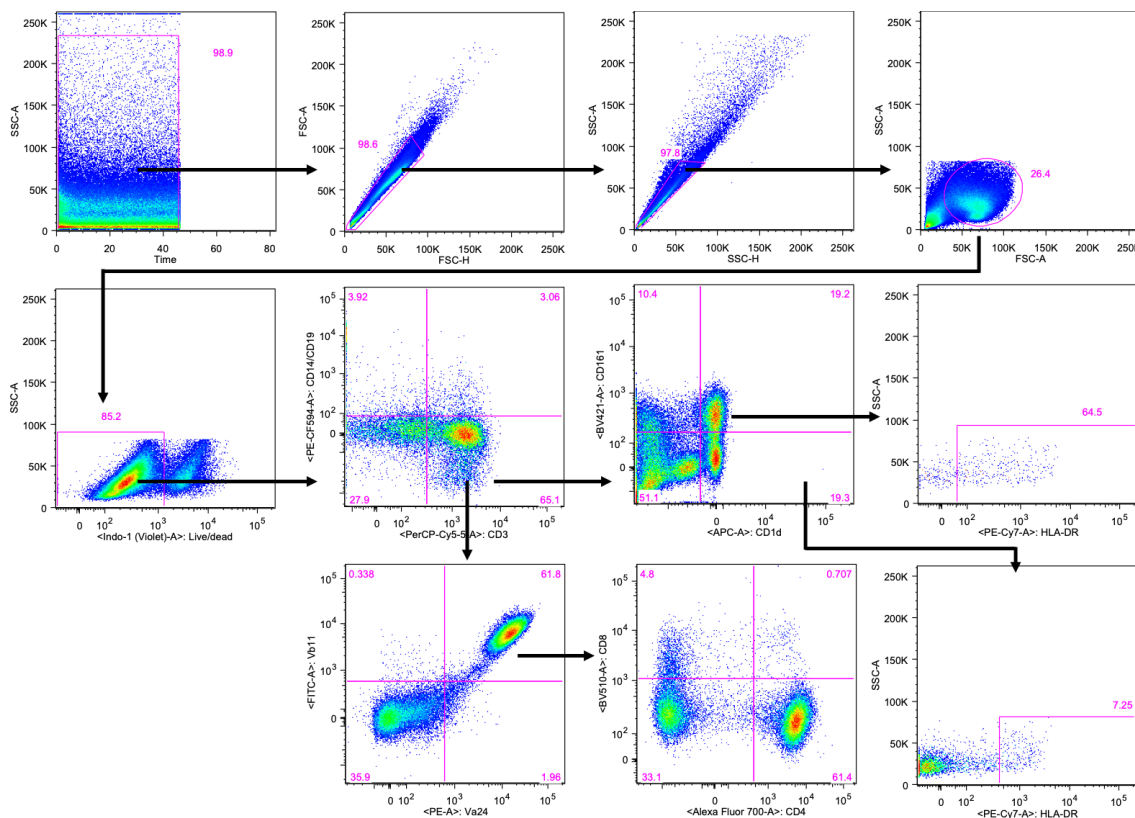
células após 10 dias em cultura. O sobrenadante foi coletado após 24 e 48 horas para dosagem de citocinas (tabela 4).

Tabela 4 – Estímulos utilizados para testes pilotos e as suas concentrações para avaliação de viabilidade celular num paciente controle saudável.

ESTIMULOS LIPIDICOS
GRUPO CONTROLE
Esfingomielina (SM) 250ng/ml
Esfingomielina (SM) 500ng/ml
Lisofosfatidilcolina (LPC) 250ng/ml
Lisofosfatidilcolina (LPC) 500ng/ml
Lisofosfatidilcolina (LPC) 750ng/ml
ESTIMULOS COM LEITE DE VACA
GRUPO CONTROLE
Leite de vaca 2mL
Leite de vaca 500uL
Leite de vaca 250uL
Leite de vaca 125uL
Leite de vaca 50uL

Após ter feito o piloto inicial, iniciamos a padronização da cultura para avaliar a população de células NKT usando as melhores concentrações determinadas nos testes pilotos para cultura de células e avaliação das células NKT por citometria.

Figura 4 – Estratégia de análise. Estratégia de análise utilizada para definir as subpopulações de células iNKT. Os gates para CD161, Va24, Vβ11 foram realizados com FMO



3.15 CULTURA DE LINFÓCITOS

A cultura de linfócitos com as PBMCs foi estimulada com leite de vaca em diferentes concentrações (leite integral UHT; leite desnatado UHT; leite integral pasteurizado) ou lipídeos isolados do leite (esfingomiéline e Lyso-PC). Utilizamos a metodologia de expansão celular com estímulos de α -GalCer e IL-2 nas PBMCs para avaliar células iNKT (Va24 x Vβ11) usando como estímulo específico a Alfa – Galactosilceramida (α -GalCer), sendo uma característica desta célula.

A partir dessas células avaliamos as subpopulações das células NKT (Tabela 5):

Tabela 5 – Fenótipos das células NKT

FENÓTIPO DE NKT	V α 24 x V β 11	V α 24 x CD1d
SUBPOPULAÇÃO NKT	CD4+ CD8+	CD4+ CD8+
	CD4+ CD8-	CD4+ CD8-
	CD4- CD8+	CD4- CD8+
	CD4- CD8-	CD4- CD8-

Os procedimentos laboratoriais foram realizados em cabine de segurança biológica devidamente esterilizada. Foi realizada a separação das células mononucleares do sangue periférico e posterior criopreservação em nitrogênio líquido para futuros ensaios imunológicos. Destas amostras também foi separado e congelado a -80°C, alíquotas de soro coletado em um tubo adicional sem anticoagulante. As células serão transferidas para criotubos nos quais ficaram a permanecer no freezer a -80°C durante 24 horas e em seguida transferido para o tanque de nitrogênio líquido. Todas as amostras permaneceram estocadas no LIM-60 até o momento da realização dos experimentos.

3.16 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma técnica de análise celular amplamente aplicada nas áreas de diagnóstico e de pesquisa. Tem sido usada para a análise de características fenotípicas e funcionais de populações e subpopulações celulares envolvidos na resposta imunológica. Com esta técnica é possível avaliar múltiplos parâmetros simultaneamente de uma mesma célula em uma

única amostra. Consiste na marcação das células com anticorpos conjugados a fluorocromos. Todas as células serão adquiridas no Citômetro de Fluxo modelo BD LSR Fortessa X-20 de 18 parâmetros utilizando o programa FACS-Diva 6.1 (BD Biosciences, San Jose, CA). A análise dos dados será realizada no programa FlowJo 9.8.3 (FlowJo Software, Tree Star, Ashland, OR).

Será realizada a imunofenotipagem de superfície celular em células mononucleares do sangue periférico e do esôfago, com o objetivo de caracterizar as células T *Natural Killer* – NKT, as amostras colhidas serão processadas para realização de imunofenotipagem de superfície celular através da técnica de citometria de fluxo. Será realizada a imunofenotipagem intracelular em células mononucleares do sangue periférico e esôfago, com o objetivo de caracterizar a produção de citocinas pelas células T *Natural Killer* – NKT (Tabela 6). Com o objetivo de aumentar o número sabido baixo de células NKT, utilizaremos a metodologia de expansão celular com estímulos de α -GalCer e IL-2 no CMSP do sangue periférico e do tecido esofágico.

Tabela 6 – Painel de anticorpos utilizados para imunofenotipagem de células iNKT.

Anticorpo	Fluorocromo
CD3	PerCPCy5.5
CD4	Alexa 700
CD8	BV510
Va24	PE
Vb11	FITC
CD1d	APC
HLA-DR	PeCy7
CD161	BV421
CD14	PE-Texas Red
CD19	PE-CF594
Live/dead	Indo-1 high/ UV

3.17 PROTOCOLO DE DIGESTÃO DE TECIDOS ESOFÁGICOS

Contamos também com o protocolo de digestão de fragmentos frescos, neste caso esôfago. O protocolo consiste em vários passos:

- Retirar os fragmentos (tecido) do frasco de transporte com uma pinça.
- Colocar o material em uma placa de Petri previamente pesada.
- No frasco de cultura, colocar 9,5mL de RPMI, 0,5mL de colagenase e 0,5uL de antibiótico e reservar.
- Dissociar o tecido com auxílio de uma pinça e bisturi, até o material tornar-se pastoso (se possível). Transferir o material, com auxílio da pinça, ou de uma pipeta para o frasco contendo RPMI- Colagenase-antibiótico.

- Manter o material sob agitação leve, em “banho-maria” a 37 C, por aproximadamente 1-2 horas, com uma barra magnética (2 cm) “peixinho”.
- Após este período, verificar se o material foi digerido, observando a ausência de fragmentos e/ou turvação do meio.
- Previamente a coleta do material digerido, providenciar uma seringa de 20mL contendo gaze e colocá-la dentro de um tubo cônico de 50mL, apoiada na borda do tubo. Umedecer a gaze com 5ml de meio RPMI. Reservar.
- Coletar o material digerido com uma pipeta de 10mL e transferi-lo para seringa plástica contendo gaze umedecida. Atenção! Ao filtrar o material mantenha somente a extremidade inferior da seringa dentro do tubo, segurando a extremidade superior com uma das mãos. Caso isso não ocorra, o material transbordará.
- Centrifugar o material filtrado por 10 minutos a 1.200 rpm, à temperatura ambiente, desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 10 ml de RPMI.
- Contar as células com *Trypan blue* enquanto são novamente centrifugadas,
- Realizar 3 centrifugações, ressuspender as células para concentração de 1×10^7 células/ml. Congelar as células para posterior uso.

3.18 DIFICULDADES DO PROCESSAMENTO DO TECIDO ESOFÁGICO

Tivemos dificuldades no processamento das amostras do tecido esofágico e na quantidade de células obtidos nas biopsias esofágicas das endoscopias digestivas altas, relacionadas ao número insuficientes de células teciduais para começar os experimentos. Foram realizados 10 testes com 10 pacientes com amostras de tecido fresco esofágico coletadas durante as

endoscopias digestivas altas, sendo posteriormente realizada a separação de células. As amostras foram coletadas de 5 controles atópicos saudáveis; 3 pacientes com EoE; 2 pacientes com EoE e APLV IgE mediada. Em reunião do grupo da pesquisa, por questões éticas, de submeter os pacientes a biópsias de fragmentos numerosos sem ter os resultados desejados, optamos por suspender esses ensaios e realizar obtenção de menor quantidade de fragmentos, que é padrão para esse tipo de procedimento diagnóstico.

Portanto, como citado acima, buscando obter mais informações das amostras biopsiadas, incluindo análise adicionais para enriquecer o trabalho de pesquisa, que foi utilizar ensaios de LUMINEX para avaliar produção de várias citocinas e quimiocinas no sangue periférico

3.19 LUMINEX

Los ensaios de luminex são um tipo de immunoensaio que especificamente consegue analisar múltiplos analitos numa amostra só. Existem várias esferas codificadas por cores ou grânulos chamadas de *Beads*, estas são tingidas internamente com diferentes fluorocromos vermelhos e infravermelhos para conseguir a quantificação de várias citocinas e outros Biomarcadores, facilitando assim resultados múltiplos com pouco quantidade de amostras. A escolha do analitos foi feito após uma exaustiva análise da fisiopatologia da EoE (Figura 1 na Fisiopatologia), onde encontramos várias citocinas e quimiocinas relevantes nos mecanismos conhecidos até atualidade, sendo escolhida a seguinte placa de Luminex: IL20, IL33, CCL11, IFN gamma, TNF alfa, IL2, IL4, IL5, IL9, IL10, IL13, IL15, IL17A/CTLA8, RANTES/CCL5, Eotaxina-3/CCL26, TSLP.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Foram incluídos 30 participantes no estudo, os quais foram divididos da seguinte forma: 16 pacientes com EoE sem sensibilização IgE para o leite de vaca e frações; 10 pacientes controles atópicos; 2 pacientes com APLV IgE mediada concomitante com Esofagite Eosinofílica e 2 pacientes somente com APLV IgE mediada. Todos os pacientes foram adultos com uma média de 31 anos de idade, com 14 participantes do sexo feminino e 16 do sexo masculino dividido entre todos os grupos de estudo e controle. Descrevemos algumas outras características dos participantes do estudo na tabela 7.

Tabela 7 – Dados demográficos dos pacientes incluídos no estudo.

ID	IDADE	SEXO	COMORBIDADES	TCLE	IgE Leite de Vaca
PACIENTES GRUPO CONTROLE ATÓPICOS					
I.L.P.	31	F	RINITE ALÉRGICA	SIM	Negativo
P.C.S.N.	25	F	RINITE ALÉRGICA	SIM	Negativo
J.T.M.S.	28	F	RINITE ALÉRGICA	SIM	Negativo
V.T.B.	19	M	RINITE ALÉRGICA	SIM	Negativo
A.P.C.P.	30	M	RINITE ALÉRGICA	SIM	Negativo
H.G.A.	29	M	RINITE ALÉRGICA	SIM	Negativo
M.M.L.	30	F	RINITE ALÉRGICA	SIM	Negativo
C.M.N.	50	F	RINITE ALÉRGICA	SIM	Negativo
H.A.C.	30	M	RINITE ALÉRGICA	SIM	Negativo
R.C.F.	42	F	RINITE ALÉRGICA	SIM	Negativo
PACIENTES GRUPO DE ESTUDO - EoE					
R. N. B.	18	M	RINITE ALÉRGICA	SIM	Negativo
V. L. P. S.	25	M	RINITE NÃO ALÉRGICA	SIM	Negativo
F. C. S.	17	M	RINITE ALÉRGICA, ASMA	SIM	Negativo
J. A. S. V.	35	M	ASMA ALÉRGICA	SIM	Negativo
A.S.F.	26	F	URTICARIA DERMOGRÁFICA	SIM	Negativo
P.S.G.	36	M	RINITE ALÉRGICA, ASMA	SIM	Negativo
B.P.F.	27	F	RINITE ALÉRGICA	SIM	Negativo
G.B.D.S.	26	F	RINITE ALÉRGICA	SIM	Negativo
K.A.N.	66	F	RINITE ALÉRGICA	SIM	Negativo
D.N.	36	M	RINITE ALÉRGICA, ASMA	SIM	Negativo
D.S.V.	35	M	SEM COMORBIDADES	SIM	Negativo
J.R.S.	66	M	DOENÇA PULMONAR OSBTRUTIVA CRONICA	SIM	Negativo
P.L.S.S.	21	F	RINITE ALÉRGICA, ASMA	SIM	Negativo
T.M.B.	24	F	Sem comorbidades	SIM	Negativo
A.R.S.	32	F	Sem comorbidades	SIM	Negativo
C.B.O.	39	F	Sem comorbidades	SIM	Negativo
PACIENTES GRUPO CONTROLE EoE e APLV IgE mediada					
M.C.S.	22	M	Sem comorbidades	SIM	POSITIVO
L.S.S.	15	M	Sem comorbidades	SIM	POSITIVO
PACIENTE GRUPO APLV IgE mediada					
I.G.F.P.	27	F	Rinite Alérgica	SIM	POSITIVO
J.M.D.S.	33	M	Rinite Alérgica	SIM	POSITIVO

4.2 PERFIL DE SENSIBILIZAÇÃO IgE e IgG4 PARA LEITE DE VACA

Foram realizadas dosagens séricas de IgE e IgG4 específicas para o leite de vaca e frações como mostra a tabela 8. Além disso, foi realizado o teste cutâneo de leitura imediata *Prick Test* para completar o perfil de sensibilização dos participantes deste estudo. Os pacientes do grupo controle atópicos e pacientes com esofagite eosinofílica apresentaram resultados negativos na avaliação da IgE específica sérica e cutânea para o leite de vaca e frações, excetuando os pacientes com APLV IgE mediada com o sem EoE. (Tabela 8).

Tabela 8 – Perfil de Sensibilização IgE/IgG4 específico para Leite de vaca

IgE específico Leite de Vaca e Frações + IgG4 específico das frações do leite de Vaca (Técnica ImmunoCap) e Prick Test com estrato do leite de vaca e frações do Leite (TC)									
NOME	GRUPO	IgE LV kU/L	Alfa lactoalbumina kU/L	Beta lactoglobulina kU/L	Caseína kU/L	IgG4 ALFA mg/ml	IgG4 BETA mg/ml	IgG4 CASEINA mg/ml	Prick Test
APCP	CONTROLE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	0,02	0,01	0,14	Negativo
HGA	CONTROLE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	0,02	0,02	0,2	Negativo
MML	CONTROLE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	1,17	0,58	0,13	Negativo
CMN	CONTROLE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	0,08	0,01	0,13	Negativo
HUC	CONTROLE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	4,69	0,23	2,68	Negativo
RCF	CONTROLE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	0,01	0,01	0,27	Negativo
ILP	CONTROLE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	0,16	0,22	1,33	Negativo
PCSN	CONTROLE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	0,004	0,003	0,03	Negativo
JTMS	CONTROLE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	3,76	1,99	0,24	Negativo
VTB	CONTROLE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	0,29	2,4	1,87	Negativo
MCS	EoE + APLV	71.7	24.7	31.9	62.7	0,42	0,67	1,31	Positivo
LSS	EoE + APLV	> 100	19.8	49.7	> 100	0,46	0,23	1,18	Positivo
JRS	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	0,01	0,01	0,11	Negativo
GBS	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	4,54	6,3	12,3	Negativo
FCS	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	10,6	9,27	14,6	Negativo
PLSS	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	1,78	0,51	1,22	Negativo
TMB	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	11,6	25,9	24,8	Negativo
VLS	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	4,02	3,69	4,75	Negativo
BPF	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	1,99	0,79	1,27	Negativo
KAN	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	15,2	5,27	13,8	Negativo
DN	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	9,44	2,33	4,18	Negativo
JASV	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	3,55	2,82	1,76	Negativo
ARS	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	0,89	1,58	0,44	Negativo
ASF	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	0,93	1,15	1,86	Negativo
DSV	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	1,25	0,08	0,46	Negativo
RNB	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	1,36	0,39	0,23	Negativo
PSG	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	0,49	0,01	0,77	Negativo
CBO	EoE	<0.35	<0.35	<0.35	<0.35	1,14	5,12	2,78	Negativo
IGFP	APLV	5.70	2.36	0.82	6.23	0,13	0,08	0,48	Positivo
JMS	APLV	60.04	18.9	11.0	59.0	0,42	0,11	0,93	Positivo

4.3 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E TECIDO ESOFAGIANO

Ao iniciarmos a separação das células do tecido esofágico, a quantidade de células obtidas foi muito pequena. Após diversas tentativas constatamos que a análise das células provenientes do tecido esofágico será tecnicamente inviável devido ao baixíssimo número de células totais recuperadas e considerando que a célula alvo para o projeto é a iNKT são extremamente raras. Considerando que para cada estímulo em cultura precisamos 7×10^6 por paciente, observamos que nas amostras de tecidos não conseguimos células suficientes para os experimentos para nenhuma das amostras testadas. A tabela 9 sumariza as células obtidas após extração de fragmentos de tecido e de sangue.

Tabela 9 – Dados das amostras coletadas por paciente e análises realizadas.

PBMC sangue, PBMC tecido. EFERS: Score Endoscópico EoE; EoEHSS: Score

Histológico EoE.

NOME	GRUPO	PBMC SANGUE	PBMC TECIDO
APCP	CONTROLE	2.8X10(6)	3.8x10(6)
HGA	CONTROLE	3.2X10(7)	1.2X10(5)
MML	CONTROLE	3.0X10(7)	1.4X10(5)
CMN	CONTROLE	47.4x10(6)	1.3X10(5)
HUC	CONTROLE	73x10(6)	1x10(5)
RCF	CONTROLE	16.5X10(6)	-
ILP	CONTROLE	33x10(6)	-
PCSN	CONTROLE	39x10(6)	-
JTMS	CONTROLE	49.5x10(6)	-
VTB	CONTROLE	39x10(6)	-
MCS	EoE + APLV	43x10(6)	8X10(4)
LSS	EoE + APLV	48x10(6)	2.2X10(5)
JRS	EoE	9x10(6)	2.6X10(5)
GBS	EoE	11x10(6)	2.4X10(6)
FCS	EoE	45x10(6)	3x10(5)
PLSS	EoE	27X10(6)	-
TMB	EoE	30x10(6)	-
VLS	EoE	30x10(6)	-
BPF	EoE	33x10(6)	-
KAN	EoE	8.25x10(6)	-
DN	EoE	12x10(6)	-
JASV	EoE	9x10(6)	-
ARS	EoE	46x10(6)	-
ASF	EoE	28x10(6)	-
DSV	EoE	37x10(6)	-
RNB	EoE	11x10(6)	-
PSG	EoE	30x10(6)	-
CBO	EoE	19X10(6)	-
IGFP	APLV	10x10(6)	-
JMS	APLV	46x10(6)	-

4.4 EoEHSS: Sistema de escore Histológico para Esofagite Eosinofílica

Avaliamos várias características histopatológicas de todos os grupos de estudo e encontramos que a média do grupo controle foi de 0.14; a média do grupo EoE foi de 0.84; a média do grupo EoE+APLV foi de 0.91 e finalmente a média do grupo APLV IgE mediada foi de 0.14. As medias do escore *EoEHSS* foram estatisticamente diferentes entre os grupos controle vs EoE (0,14 vs 0,84) e os grupos controle vs EoE+APLV (0,14 vs 0.91), tabela 10.

4.5 EFERS: Escore de Referência Endoscópica da Esofagite

Eosinofílica

Este escore mostrou informação útil para a classificação do padrão endoscópico dos participantes do estudo: nos padrões Inflamatório, Fibroestenótico ou misto. No grupo controle e grupo APLV IgE mediado não foram observadas características endoscópicas deste escore; dentro do grupo EoE+APLV com dois participantes, encontramos 1 paciente com um padrão inflamatório e o outro com padrão endoscópico misto; no grupo EoE 8 pacientes apresentavam padrões inflamatórios, 6 pacientes padrões mistos, 1 paciente padrão Fibroestenótico e apenas 1 paciente sem alterações macroscópicas observadas (Tabela 11)

Tabela 11 – Dados de avaliação endoscópica segundo o EFERS

GRUPO	IP1 ORY	ANIS GRAU 0/1/2/3	EXUZATOS GRAU 0/1/2	ESTRIAS GRAU 0/1	EDMA GRAU 0/1	ESTINOSIS GRAU 0/1	PAPILI (REPOB) GRAU 0/1	Padrão Inflamatório	Misto	Fibroestenótico	Outrum
1	CONTROLE	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	CONTROLE	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3	CONTROLE	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0	0	0	1
4	CONTROLE	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5	CONTROLE	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0	0	0	1
6	CONTROLE	POSITIVO	0	0	0	0	0	0	0	0	1
7	CONTROLE	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0	0	0	1
8	CONTROLE	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0	0	0	1
9	CONTROLE	POSITIVO	0	0	0	0	0	0	0	0	1
10	CONTROLE	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0	0	0	1
								0	0	0	10
11	EoE	NEGATIVO	0	1	0	0	0	1	0	0	0
12	EoE	NEGATIVO	0	2	1	1	0	1	0	0	0
13	EoE	NEGATIVO	0	1	1	1	0	1	0	0	0
14	EoE	NEGATIVO	0	1	1	1	0	1	0	0	0
15	EoE	POSITIVO	0	1	1	1	0	1	0	0	0
16	EoE	NEGATIVO	0	2	1	1	0	1	0	0	0
17	EoE	POSITIVO	2	0	1	1	0	0	1	0	0
18	EoE	NEGATIVO	1	1	1	1	0	0	1	0	0
19	EoE	NEGATIVO	3	2	1	1	1	0	1	0	0
20	EoE	NEGATIVO	0	2	0	0	0	1	0	0	0
21	EoE	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	EoE	NEGATIVO	0	0	1	1	0	1	0	0	0
23	EoE	NEGATIVO	1	1	1	1	0	0	1	0	0
24	EoE	NEGATIVO	1	1	1	0	0	0	1	0	0
25	EoE	NEGATIVO	3	1	1	1	1	0	1	0	0
26	EoE	NEGATIVO	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Total								8	6	1	0
27	EoE + APLV	NEGATIVO	0	0	1	1	0	1	0	0	0
28	EoE + APLV	NEGATIVO	2	0	1	0	0	0	1	0	0
29	APLV	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0	0	0	1
30	APLV	POSITIVO	0	0	0	0	0	0	0	0	1
								1	1	0	2

4.6 Resultados dos testes para padronização da dose dos estímulos e dosagem de citocinas

Primeiramente foram testadas diferentes concentrações dos estímulos utilizados para verificar o máximo de dose que mantinha a viabilidade células após 10 dias de cultura:

- Esfingomielina – 250 ng/ml e 500 ng/ml;
- Lyso-PC – 250 ng/ml, 500 ng/ml e 750 ng/ml;
- Leite integral UHT, desnatado UHT e integral pasteurizado – 2 ml, 1 ml, 500 µl, 150 µl, 125 µl e 50 µl.

Os resultados destes testes guiaram a padronização da cultura para avaliar a população de células iNKT, usando as melhores concentrações para os testes. As melhores concentrações nos testes pilotos foram: 250 ng/ml de esfingomielina e lisofodfatidilcolina; 125 uL de leite para cultura de células e avaliação das células iNKT por Citometria de fluxo., tabela 12.

Tabela 12 – Viabilidade celular após 10 dias de cultura com ou sem estímulo.

CN-Controlle negativo; SM – Esfingomielina; LPC – Lisofosfatidilcolina.

Condição	Viabilidade dia 10
CN	89%
SM 250ng/ml	86%
SM 500ng/ml	58%
LPC 250ng/ml	75%
LPC 500ng/ml	46%
LPC 750ng/ml	73%
Leite 2mL	63%
Leite 500uL	51%
Leite 250uL	58%
Leite 125uL	72%
Leite 50uL	73%

Após o teste piloto para expansão de células iNKT, os melhores parâmetros foram:

- Plaqueamento inicial da cultura com 1×10^6 de células por poço;
- Esfingomielina 250 ng/ml;
- Lyso-PC 250 ng/ml;
- Leites integral UHT, desnatado UHT e integral pasteurizado – 125 µl;
- 10 dias de cultura, com troca de meio e acréscimo de IL-2 e α -GalCer no 5º dia.

4.7 Cultura de células com diferentes estímulos em amostras de PBMC congeladas

As amostras pós-cultura foram analisadas conforme a estratégia de análise mostrada na Figura 4. As medianas das células iNKT frente aos diferentes estímulos de todas as amostras testadas estão descritas na tabela 13. Os resultados das análises da imunofenotipagem das células iNKT (CD3+, CD14, CD19-/V α 24+ V β 11+) encontram-se na Tabela 14 e Tabela 15 mostrados no gráfico da figura 5.

Tabela 13 – Mediana de células iNKT frente aos diferentes estímulos de todas as amostras testadas.

Estímulo	iNKT mediana	Grupo	Estímulo	iNKT mediana	Grupo
CN	0,99%	EoE	CN	1,56%	Controles
LP	1,44%		LP	2,45%	
PT	1,65%		PT	2,04%	
SM	1,98%		SM	2,70%	
UHT	1,46%		UHT	2,60%	

Figura 5 – Razão de células NKT (Va24Vb11) Pré/pós estímulo. CN:Controle Negativo; LP:Lyso-PC; PT:Leite pasteurizado; SM:esfingomiolina; UHT: leite UHT.

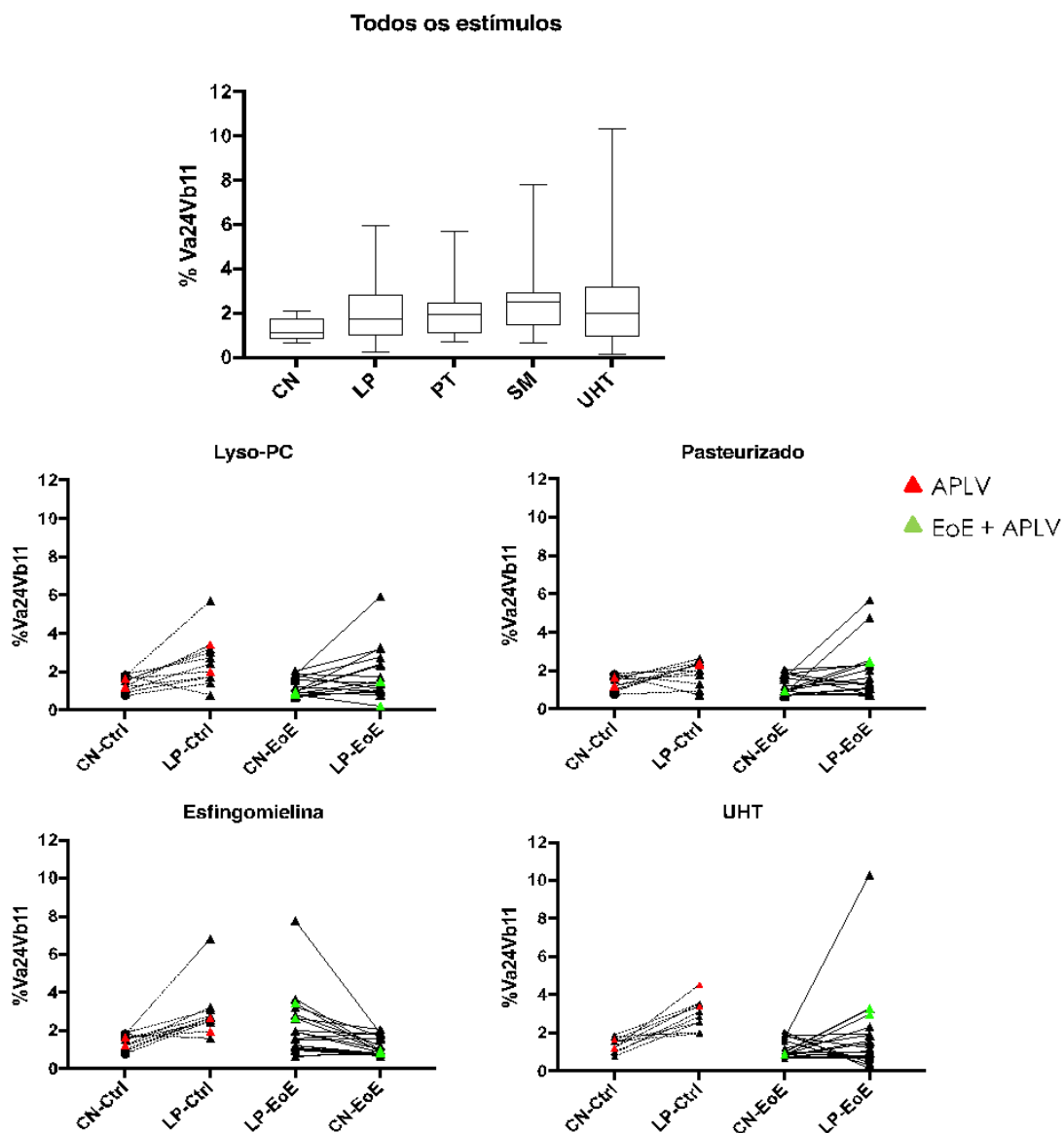


Tabela 14 – População de células NKT pós expansão com diferentes estímulos para amostras de indivíduos com EoE. CN – Controle negativo (sem estímulo); LP – Lipídeo Lyso-PC; PT – Leite Pasteurizado; SM – Esfingomiolina; UHT – Leite UHT

Grupo EoE	Estímulo	CD3+CD14-CD19-VA24+VB11+	Grupo EoE	Estímulo	CD3+CD14-CD19-VA24+VB11+
EoE10	CN	1,92%	EoE21	CN	1,22%
	LP	1,75%		LP	0,98%
	PT	0,76%		PT	1,34%
	SM	1,61%		SM	2,83%
	UHT	0,42%		UHT	1,89%
EoE11	CN	1,58%	EoE22	CN	0,77%
	LP	1,44%		LP	0,98%
	PT	1,39%		PT	1,10%
	SM	1,55%		SM	1,03%
	UHT	0,36%		UHT	0,83%
EoE12	CN	0,95%	EoE23	CN	0,68%
	LP	0,82%		LP	1,04%
	PT	0,72%		PT	1,12%
	SM	0,65%		SM	0,98%
	UHT	0,83%		UHT	0,78%
EoE13	CN	2,09%	EoE24	CN	0,85%
	LP	3,21%		LP	0,97%
	PT	2,30%		PT	2,46%
	SM	2,66%		SM	1,98%
	UHT	0,17%		UHT	2,34%
EoE14	CN	1,82%	EoE25	CN	0,76%
	LP	1,12%		LP	0,98%
	PT	2,35%		PT	0,85%
	SM	2,00%		SM	1,23%
	UHT	1,22%		UHT	1,08%
EoE15	CN	1,90%	EoE26	CN	1,03%
	LP	5,95%		LP	2,35%
	PT	1,22%		PT	1,65%
	SM	7,79%		SM	1,98%
	UHT	1,93%		UHT	3,32%
EoE16	CN	0,79%	EoE+APLV27	CN	0,87%
	LP	1,37%		LP	1,54%
	PT	0,79%		PT	2,45%
	SM	1,23%		SM	3,46%
	UHT	0,68%		UHT	2,98%
EoE17	CN	1,70%	EoE+APLV28	CN	0,98%
	LP	2,76%		LP	2,42%
	PT	5,71%		PT	2,54%
	SM	3,24%		SM	2,67%
	UHT	10,30%		UHT	3,30%
EoE18	CN	0,99%	APLV29	CN	1,24%
	LP	3,29%		LP	3,45%
	PT	2,06%		PT	2,34%
	SM	3,68%		SM	2,67%
	UHT	0,99%		UHT	4,56%
EoE19	CN	0,82%	APLV30	CN	1,67%
	LP	0,25%		LP	2,04%
	PT	4,78%		PT	2,43%
	SM	1,13%		SM	1,98%
	UHT	1,59%		UHT	3,42%
EoE20	CN	0,79%			
	LP	1,03%			
	PT	1,12%			
	SM	0,67%			
	UHT	1,46%			

Tabela 15– População de células NKT pós expansão com diferentes estímulos para amostras controle.

Grupo Controle	Estímulo	CD3+CD14-CD19-VA24+VB11+
Ctrl1	CN	0,95%
	LP	1,75%
	PT	2,45%
	SM	2,67%
	UHT	3,14%
Ctrl2	CN	1,82%
	LP	0,82%
	PT	0,76%
	SM	1,61%
	UHT	2,05%
Ctrl3	CN	1,58%
	LP	3,05%
	PT	2,65%
	SM	2,78%
	UHT	1,98%
Ctrl4	CN	0,11%
	LP	1,44%
	PT	0,98%
	SM	2,56%
	UHT	2,60%
Ctrl5	CN	1,82%
	LP	5,72%
	PT	1,34%
	SM	6,84%
	UHT	2,04%
Ctrl6	CN	1,90%
	LP	2,76%
	PT	2,04%
	SM	3,10%
	UHT	3,56%
Ctrl7	CN	1,24%
	LP	1,76%
	PT	2,05%
	SM	3,24%
	UHT	3,56%
Ctrl8	CN	1,56%
	LP	3,21%
	PT	1,80%
	SM	2,45%
	UHT	2,56%
Ctrl9	CN	1,04%
	LP	2,45%
	PT	2,38%
	SM	2,70%

4.8 Dosagem de citocinas a partir de estímulo com os diferentes lipídeos

Fizemos a dosagem por Luminex de citocinas produzidas após 48 horas de estímulo com Lyso-PC ou esfingomiéline. Devido ao volume de leite necessário na cultura e à quantidade necessária de meio de cultura para as células, o volume coletado para o Luminex forneceu uma amostra muito diluída e a quantidade de citocinas produzidas foi indetectável. Sendo assim, somente foi possível realizar o experimento com os lipídeos esfingomiéline e Lyso-PC, mas não com os leites. O painel incluiu citocinas relatadas na literatura no envolvimento da esofagite eosinofílica, características clínicas e dados de citocinas do sobrenadante de cultura após 48 horas de estímulos obtidos no luminex na Tabela 16 e Tabela 17 respectivamente.

Dentre as quimiocinas quimiotáticas para eosinófilos (Eotaxina 1/CCL11, Eotaxina 3/CCL26 e RANTES/CCL5), a quimiocina mais estimulada foi a CCL11 (figura 6). Quando analisamos as citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) observamos que houve grande variação individual, sendo que cerca de 50% das amostras não tiveram aumento de expressão dessas citocinas (Figura 7).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias testadas: IL-2, IFN-gama e TNF-alfa o aumento da expressão dessas citocinas também variou individualmente, tendo cerca de 50-60% das amostras testadas um aumento de expressão frente os estímulos. Não houve diferença estatística entre os diferentes lipídeos ou entre controles e doentes, sendo a citocina com maior aumento IL-2 (figura 4).

Para as citocinas IL-9, IL-15 e IL-17 houve um aumento para a maioria das amostras testadas, que variou de 1.2 a 7.6 vezes, sendo o maior aumento observado para IL-17. (Figura 5)

Já as alarminas IL-33, TSLP e IL-20 houve um menor aumento (1,1 a 2,3 vezes), quando comparadas as demais citocinas, para 70% das amostras testadas, tendo sido maior o aumento pós estímulo com Lyso-PC, mas não estatisticamente significativo. (Figura 5

TABELA 16 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES DO LUMINEX										
	MCS EoE + APLV	GBSS EoE	FCS EoE	PLSS EoE	ASF EoE	VLPS EoE	BPF EoE	ARS EoE	HAC Controle	CMN Controle
Idade do Paciente	22 anos	26 anos	17 anos	21 anos	26 anos	25 anos	27 anos	32 anos	30 anos	50 anos
Sexo	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Feminino	Masculino	Feminino	Feminino	Masculino	Feminino
Atopias Associadas	APLV IgE mediada	Rinite Alérgica Asma Alérgica Dermatite Atópica	Asma Alérgica Rinite Alérgica	Rinite Alérgica Asma Alérgica Dermatite Atópica	Dermatite Atópica	Rinite Alérgica	Rinite Alérgica	Asma Alérgica Rinite Alérgica	Rinite Alérgica Asma Alérgica	Rinite Alérgica Dermatite Atópica
Idade Início Sintomas de EoE	20 anos	10 anos	15 anos	14 anos	17 anos	18 anos	25 anos	13 anos	-	-
Idade Dx EoE	20 anos	20 anos	16 anos	18 anos	18 anos	21 anos	25 anos	28 anos	-	-
Idade Início Tratamento	20 anos	20 anos	17 anos	18 anos	18 anos	21 anos	25 anos	28 anos	-	-
História Familiar EoE	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Washout de Tratamento	12 semanas	12 semanas	12 semanas	12 semanas	12 semanas	12 semanas	12 semanas	12 semanas	12 semanas	12 semanas
Sintomas durante Washout	Impactação alimentar	Regurgitação; Pirose	Plenitude Gástrica Precoce	Regurgitação; Disfagia	Regurgitação; Pirose	Nenhum sintoma	Disfagia	Disfagia e Impactação Alimentar	Nenhum sintoma	Nenhum sintoma
Caraterísticas Endoscópica	Estrias Longitudinais	Exsudatos esbranquiçados; Estrias Longitudinais; Edema de Mucosa	Exsudatos esbranquiçados; Estrias Longitudinais; Edema de Mucosa	Exsudatos esbranquiçados; Estrias Longitudinais; Edema de Mucosa	Exsudatos Esbranquiçados; Estrias Longitudinais; Anéis concêntricos	Exsudatos Esbranquiçados; Estrias Longitudinais; Anéis concêntricos; Estenose esofágica	Nenhuma alteração	Estrias Longitudinais; Edema de Mucosa	Nenhuma alteração	Nenhuma alteração
Padrão Endoscópico	Inflamatório	Inflamatório	Inflamatório	Inflamatório	Misto	Misto	Nenhum	Inflamatório	Nenhum	Nenhum
Eosinófilos no Esófago	17 eos/CGA	30 eos/CGA	35 eos/CGA	30 eos/CGA	15 eos/CGA	140 eos/CGA	15 eos/CGA	43 eos/CGA	Nenhum	Nenhum
Caraterísticas Anatomopatológicas	Hiperplasia Camada Basal; Espongiosis	Hiperplasia Camada Basal; Espongiosis	Abcessos eosinofílicos; Hiperplasia camada basal; Espongiosis	Hiperplasia Camada Basal; Espongiosis	Hiperplasia Camada Basal; Espongiosis	Abcessos eosinofílicos; Hiperplasia camada basal; Espongiosis	Espongiosis	Hiperplasia Camada Basal; Espongiosis	Nenhum	Nenhum
IgE Leite de Vaca	71.7 kU/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L
IgE Alfalactoalbumina	24.7 kU/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L
IgE Betalactoglobulina	31.9 kU/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L
IgE Caseína	62.7 kU/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L	< 0.35 Ku/L
IgG4 Alfalactoalbumina	0.42 mg/ml	4.54 mg/ml	10.6 mg/ml	1.78 mg/ml	0.93 mg/ml	4.02 mg/ml	1.99 mg/ml	0.89 mg/ml	0,08 Ku/L	4,69 Ku/L
IgG4 Betalactoglobulina	0.67 mg/ml	6.3 mg/ml	9.27 mg/ml	0.51 mg/ml	1.15 mg/ml	3.69 mg/ml	0.79 mg/ml	1.58 mg/ml	0,01 Ku/L	0,23 Ku/L
IgG4 Caseína	1.31 mg/ml	12.3 mg/ml	14.4 mg/ml	1.22 mg/ml	1.86 mg/ml	4.79 mg/ml	1.27 mg/ml	0.44 mg/ml	0,13 Ku/L	2,68 Ku/L
Prick Test Leite de Vaca	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
EoE: Eosinophilic Esophagitis, APLV: alergia a la proteína do leite de vaca, CGA: Campo de grande aumento										

Tabela 17 – Dados de citocinas do sobrenadante de cultura após 48 horas de estímulo obtidos por Luminex.

	Analyte	Esrxin LP	IFN gamma LP	IL-10 LP	IL-13 LP	IL-15 LP	IL-17A LP	IL-9 LP	IL-2 LP	IL-4 LP	IL-5 LP	Rantes LP	TNFα16 LP	Esrxin-3 LP	TSLP LP	IL-33 LP	IL-20 LP
		pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
MCS EoE/APLV	33 LP	5,17	3,29	5,79	4,48	3,62	1,94	2,21	2,27	2,164	2,64	11437	3,76	20,17	1,56	3,08	25,71
	33 SM	5,17	2,21	5,79	3,29	2,93	1,94	2,21	2,27	10,3	2,64	11660	3,2	20,17	1,4	2,45	26,86
	33 CN	2,2	1,47	3,29	2,43	1,63	0,53	1,42	1,42	1,34	1,98	8008	2,74	20,17	1,56	2,72	23,51
De/b (estímulo/CN)	33 LP	4,168181818	2,238095238	1,759878	1,843621	2,2208589	3,6603774	1,556338	1,5985915	16,1492537	1,333333	1,2696492	1,372263	1	1	1,13235294	1,0935772
	33 SM	4,168181818	1,503401361	1,759878	1,353909	1,797546	3,6603774	1,556338	1,5985915	7,68656716	1,333333	1,294405	1,167883	1	0,89744	0,90073529	1,14249256
	33 CN	2,2	1,47	3,29	2,43	1,63	0,53	1,42	1,42	1,34	1,98	8008	2,74	20,17	1,56	2,72	23,51
G BSS EoE	35 LP	2,2	1,47	3,29	2,43	2,45	0,44	1,66	1,19	10,3	1,98	7944	2,74	18,27	1,32	2,19	16,73
	35 SM	5,17	2,21	5,79	3,29	2,45	1,64	2,21	1,42	10,3	2,3	8911	3,2	20,17	1,32	2,37	24,6
	35 CN	5,17	1,47	3,29	2,43	2,01	1,14	1,66	1,67	10,3	2,3	8176	2,74	24,24	1,65	2,9	26,86
De/b (estímulo/CN)	35 LP	0,239912759	1	1	1,353909	1,2189055	0,3859649	1	0,7125749	1	0,86087	0,9716243	1	0,753713	0,8	0,75517241	0,62285927
	35 SM	1	1,503401361	1,759878	1,353909	1,2189055	1,4385965	1,331325	0,8502994	1	1	1,0898973	1,167883	0,832096	0,8	0,81724138	0,91586001
	35 CN	5,66	4,42	11,58	6,57	4,88	2,29	3,88	3,91	43,27	4,6	20853	6,4	44,32	2,96	4,73	56,08
FCS EoE	36 LP	16,33	4,42	11,58	6,57	4,88	3,27	4,42	3,34	20,61	5,28	21792	6,4	32,84	2,64	4,64	35,22
	36 SM	5,17	2,21	5,79	3,29	2,93	1,64	2,21	1,67	10,3	2,3	11728	3,76	38,78	2,07	3,43	24,6
	36 CN	0,617230098	2	2	1,99696	1,668942	1,3963415	1,742081	2,3413174	4,20097087	2	1,7779009	1,702128	1,143742	1,42995	1,3790875	2,2796748
De/b (estímulo/CN)	36 LP	1	1,998909487	2	2	1,9969605	1,668942	1,993902	2	2	2,000971	2,2955522	1,357959	1,702128	0,85006	1,27536232	1,35276963
	36 SM	40,57	53,5	63,8	42,66	33,18	32,35	22,75	23,33	370,93	22,75	8568	30	18,27	1,24	2,1	15,87
	36 CN	5,17	2,21	5,79	3,29	2,45	1,14	2,21	2,27	2,164	2,3	4724	3,2	22,16	1,24	2,19	13,09
PLSS EoE	37 LP	20,57	18,14	21,1	14,05	8,64	4,27	4,09	5,2	100,32	5,78	5791	8,8	22,16	1,32	2,19	11,3
	37 SM	1,972289742	2,949283352	3,023697	3,036299	3,8402778	7,6761124	5,562347	4,4365385	3,6974681	3,929188	1,4795372	3,370787	0,824458	0,93939	0,95890411	1,0442478
	37 CN	0,445794347	0,12183	0,274408	0,2341637	0,2835648	0,266979	0,5403423	0,43653846	0,21571	0,3972366	0,815749	0,359551	1	0,93939394	1	1
De/b (estímulo/CN)	37 LP	5,17	2,21	4,27	3,29	2,45	0,95	1,92	1,95	10,3	1,98	5917	3,2	20,17	1,32	2,32	22,45
	37 SM	2,2	2,21	3,29	3,29	2,45	1,37	1,92	1,95	10,3	1,98	10454	3,2	18,27	1,48	2,67	18,52
	37 CN	12,24	3,29	5,79	3,29	2,45	0,95	1,66	1,95	10,3	2,3	10008	3,2	16,47	1,24	2,1	15,87
De/b (estímulo/CN)	38 LP	0,749183007	0,671732523	0,737478	1	1	1	1,156627	1	1	0,86087	0,9909073	1	1,224651	1,06452	1,1047619	1,41461878
	38 SM	0,179738562	0,671733	0,568221	1	1	1	1,442105	1,1566265	1	1	0,8608696	1,044564	1	1,10929	1,19354339	1,27142857
	38 CN	16,33	6,57	11,58	8,95	5,87	2,29	4,42	3,91	43,27	4,6	21181	6,4	40,34	2,64	4,38	40,86
De/b (estímulo/CN)	40 LP	5,17	2,21	3,29	4,48	2,68	1,14	2,06	1,95	10,3	2,3	10866	3,76	18,27	1,24	2,02	14,24
	40 SM	2,2	3,29	5,79	3,29	2,93	1,14	2,21	1,95	2,164	2,3	11261	3,76	20,17	1,32	2,54	21,43
	40 CN	8,331818182	1,996960486	2	2,720365	2,003413	2,0087719	2	2,0051282	1,99953789	2	1,8809164	1,702128	2	2	1,72440945	1,90667289
De/b (estímulo/CN)	40 LP	4,168181818	0,671733	0,568221	1,3617021	0,9146758	1	0,9321267	1	0,47597	1	0,964923	1	0,9058	0,93939394	0,9527559	
	41 LP	2,2	1,47	5,79	2,43	2,45	1,37	1,92	1,92	10,3	1,98	6453	2,74	22,16	1,48	2,34	30,48
	41 SM	2,83	1,47	3,29	2,43	2,45	1,14	1,92	1,67	10,3	2,3	7481	2,74	20,17	1,65	2,54	32,41
De/b (estímulo/CN)	41 LP	0,72	0,94	3,29	1,78	2,01	0,44	1,42	1,19	1,34	1,98	6232	2,31	18,27	1,4	2,54	26,86
	41 SM	3,055555556	1,563829787	1,759878	1,365169	1,2189055	3,1136364	1,352113	1,4033613	7,68656716	1	1,0354621	1,186147	1,212917	1,05714	1	1,1351452
	41 CN	3,930555556	1,56383	1	1,3651685	1,2189055	2,590909	1,3521127	1,40336134	7,686567	1,1616162	1,200417	1,186147	1,104	1,17857143	1	1
De/b (estímulo/CN)	42 LP	5,17	2,21	5,79	3,29	2,45	1,37	2,21	1,95	2,164	2,3	11882	3,76	20,17	1,48	2,63	24,6
	42 SM	2,2	2,21	5,79	3,29	2,45	1,14	1,82	2,61	2,164	2,3	10736	3,76	18,27	1,32	2,19	17,61
	42 CN	5,17	1,47	5,79	3,29	2,45	1,14	2,36	1,67	2,164	2,3	11662	4,48	20,17	1,32	2,32	19,46
De/b (estímulo/CN)	42 LP	1	1,503401361	1	1	1	1,2017544	0,936441	1,1676647	1	1	1,0188647	0,839286	1	1,12121	1,13362069	1,26413155
	42 SM	0,239912759	1,503401	1	1	1	1	0,8135593	1,56297425	1	1	0,920597	0,839286	0,9058	1	0,94396552	
	34 LP	5,17	1,47	3,29	2,43	2,45	0,79	1,66	1,67	10,3	2,3	8888	2,74	16,47	1,4	2,54	21,43
De/b (estímulo/CN)	34 SM	5,17	2,21	3,29	2,43	2,45	1,37	1,92	1,67	10,3	1,98	7797	2,74	17,36	1,24	2,15	16,73
	34 CN	1,28	0,94	3,29	2,43	2,45	0,53	1,42	1,19	10,3	1,98	7037	2,74	18,27	1,16	2,19	21,43
	34 LP	7,108527132	1,563829787	1	1	1	1,490566	1,169014	1,4033613	1	1,161616	1,2772488	1	1,206897	1,15982	1,15981735	1
De/b (estímulo/CN)	34 SM	7,108527132	1,56383	1	1	1	1,490566	1,169014	1,40336134	1	1,1616162	1,277249	1	0,95019	1,06896552	0,98173516	
	38 LP	1,88	4,28	3,57	4,02	0,71	2,84	3,34	2,68	3,96	2933	3,86	62,14	2,8	4,38	15,3	
	38 SM	1,47	2,63	2,43	2,45	0,95	1,66	1,67	1,34	2,3	3454	2,31	26,42	1,65	2,72	28,04	
De/b (estímulo/CN)	38 CN	2,94	4,28	4,86	4,02	2,29	3,85	3,91	2,68	4,6	6763	4,63	36,55	2,8	5,26	56,08	
	38 LP	0,639455782	0,639455782	1	0,734568	1	0,3100437	0,737662	0,8542199	1	0,86087	0,4336833	0,833693	1,700137	1	0,83269962	0,27282454
	38 SM	0,5	0,5	0,614486	0,5	0,6094527	0,414847	0,4311688	0,42710997	0,5	0,5	0,51072	0,49892	0,72285	0,58928571	0,51711027	
EoE	CN	5,17	2,21	5,79	3,29	2,93	1,14	1,92	1,95	10,3	2,3	10882	4,48	20,17	1,24	2,37	17,61
	LP	5,17	3,29	7,26	3,62	2,93	1,14	2,21	2,11	16,83	2,64	10884	3,76	20,17	1,2	2,37	17,61
	SM	16,33	6,57	11,58	6,57	5,87	2,29	4,42	3,91	43,27	5,28	21921	7,93	36,55	2,64	4,56	47,02
De/b (estímulo/CN)	LP(ng/ml - CP	0	1,08	1,47	0,33	0	0	0,29	0,16	6,53	0,34	2	-0,72	0,551847	0,4697	0,5	0,37452148
	SM(ng/ml - CP	9,16	4,36	5,79	3,28	2,94	1,15	2,5	1,96	32,97	2,98	10489	3,05	0,551847	0,45455	0,51973684	0,37452148
	Centile 1	213,32 (115-239)	235,89 (85-198)	244,96 (108-224)	257,95 (106-221)	202,85 (84-195)	235,89 (108-224)	227,16 (110-229)	254,38 (97-102)	208,02 (97-202)	235,89 (120-250)	214,18 (100-209)	224,32 (86-139)	488,51 (88-106)	158 (111-131)	348,25 (220-457)	636,14 (540-1123)
De/b (estímulo/CN)	Centile 2	585,08 (512-1063)	1040 (486-1029)	1179 (544-1130)	1014 (538-1117)	917,21 (483-1003)	585,08 (523-1085)	840,56 (650-1143)	1067 (680-1018)	585,08 (446-827)	1027 (553-1148)	1042 (518-1077)	564,52 (465-566)	2685 (2082-4324)	618,27 (627-886)	1423 (860-1786)	2410 (2167-4500)

Figura 6 – Analitos analisados por Luminex, incluindo citocinas e quimiocinas para 11 amostras, sendo 8 indivíduos EoE e 2 controles.

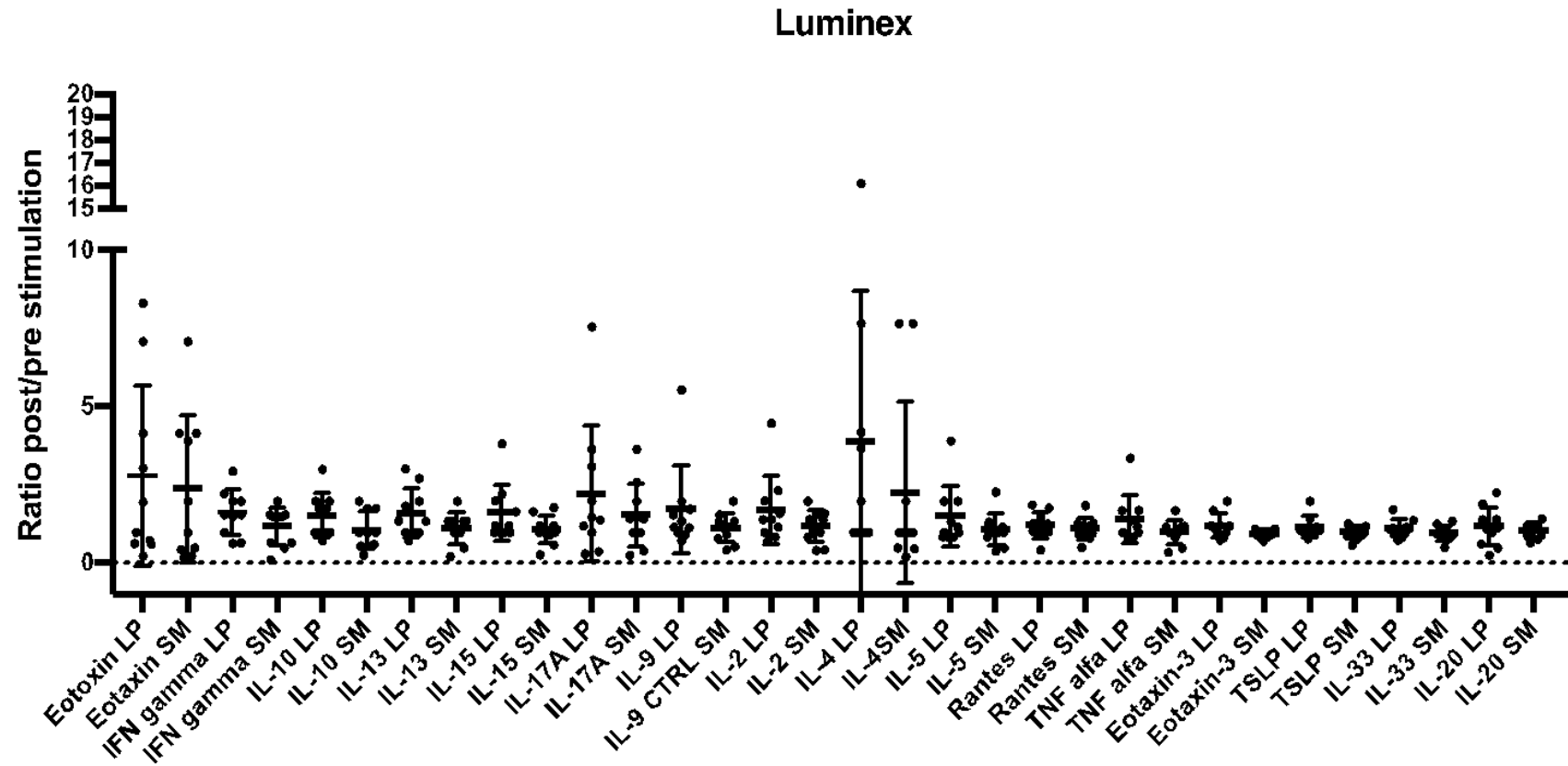


Figura 7 – Quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante de cultura frente aos diferentes estímulos por 48 horas. Os pontos verdes indicam amostra do indivíduo EoE+APLV e os vermelhos correspondem às amostras controle sem APLV nem EoE.

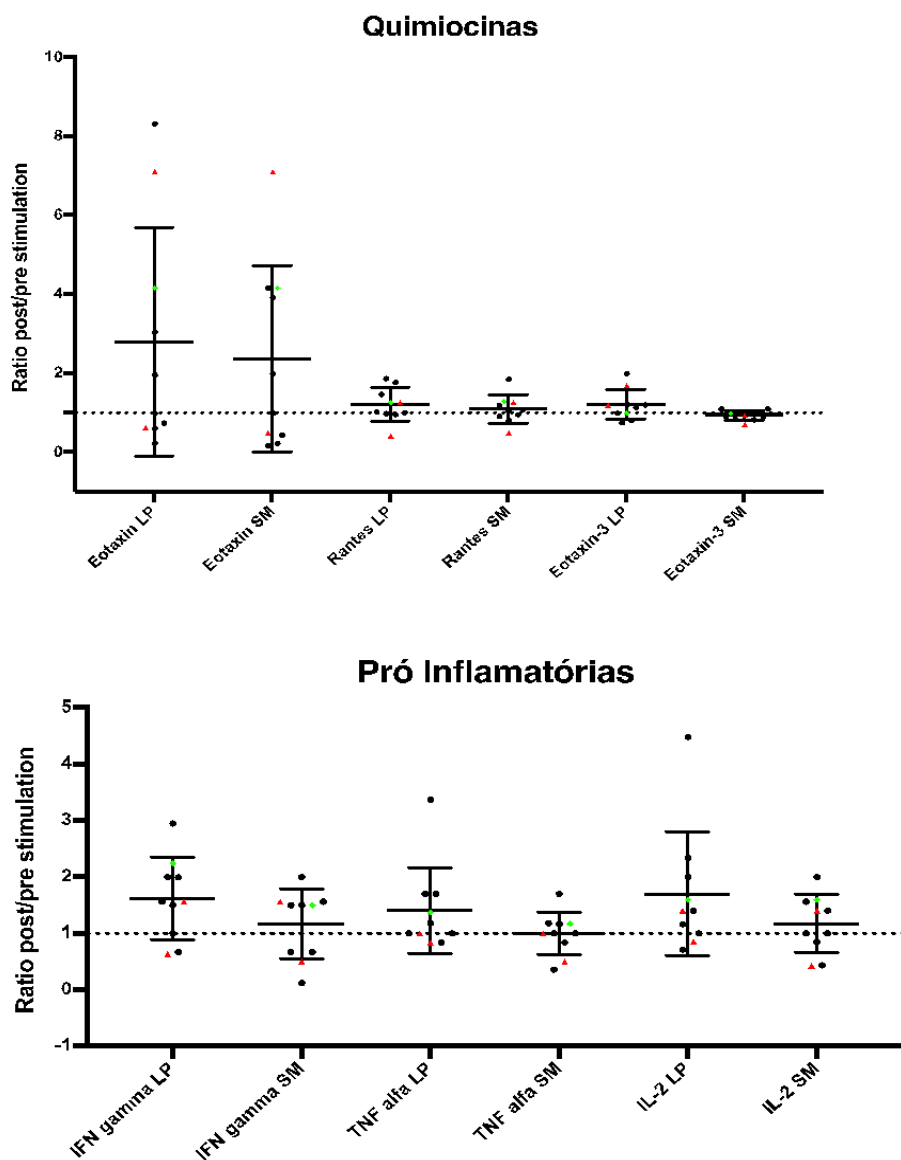
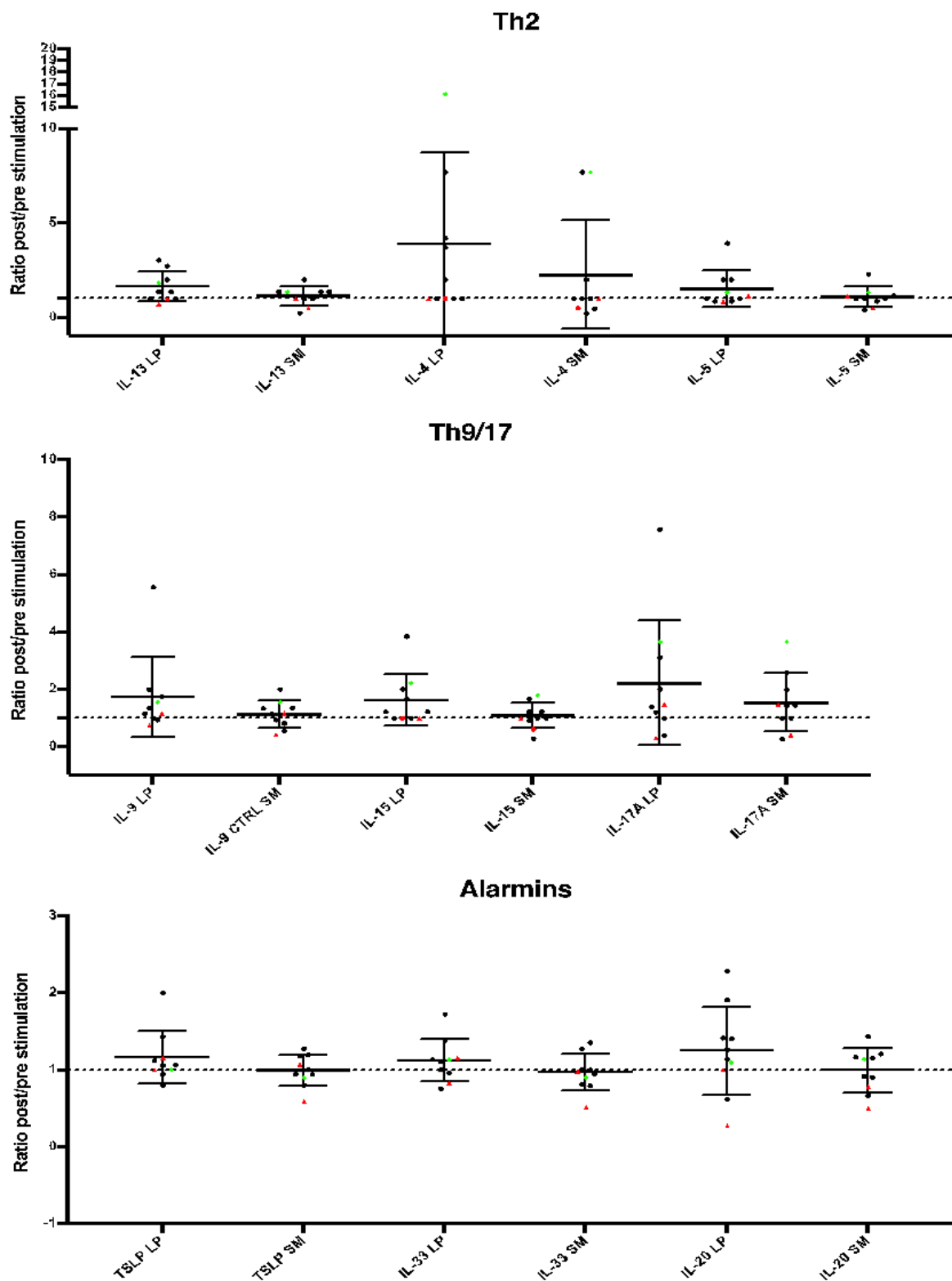


Figura 8 – Citocinas agrupadas por perfil: Th2, Th9/17 e alarminas. Os pontos verdes indicam amostra do indivíduo EoE+APLV e os vermelhos correspondem às amostras controle sem APLV nem EoE



4.9 Cultura de células com diferentes estímulos em amostras de PBMC frescas

Para avaliar se o congelamento das células teria influenciado no experimento, já que não houve a expansão de células iNKT esperada frente aos estímulos, conseguimos incluir 4 pacientes recém-diagnosticados, ainda sem uso de medicamentos, para fazer uma cultura de células a partir de amostras de sangue fresco. (FIGURA 9)

Figura 9 – Porcentagem de células iNKT Va24/Vb11 após estímulo em cultura por dez dias.

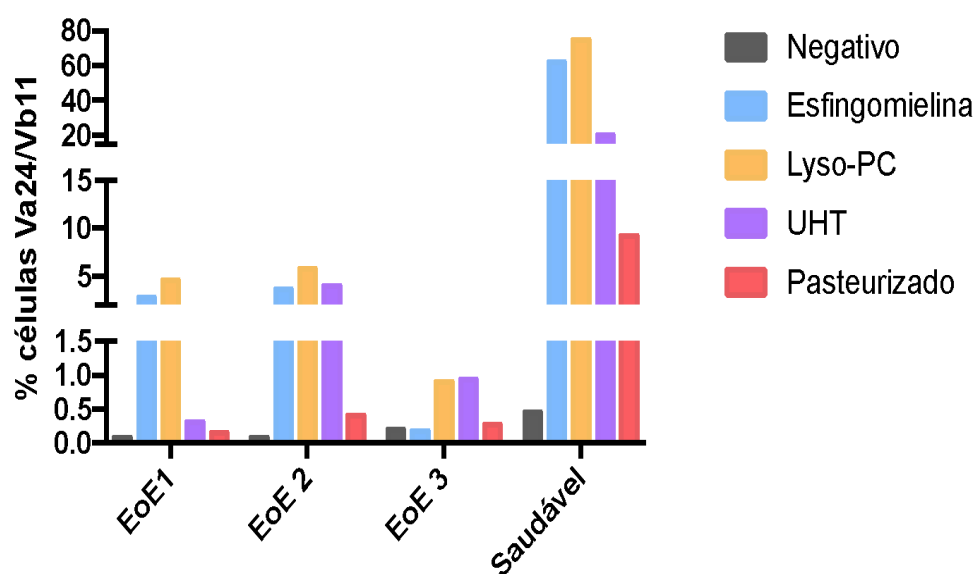
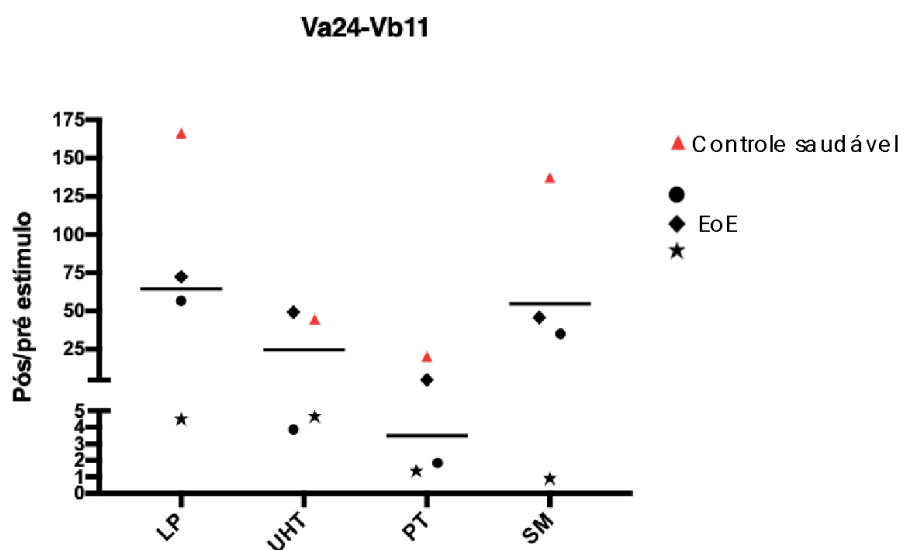


Figura 10 – Razão da % de células iNKT estimulado/não estimulado. LP: Lyso-PC; UHT: Leite integral UHT; PT: Leite integral pasteurizado; SM: esfingomiélinea.



Embora tenha ocorrido a proliferação de células iNKT com todos os estímulos em todas as amostras, a quantidade destas células em indivíduos com EoE se mantém consideravelmente menor em relação à amostra controle. Ao observar a expressão de nossas subpopulações de iNKT, nota-se que as células iNKTCD4+ tiveram expansão maior ultrapassando a população iNKTCD4-CD8-

(TABELA 18 – FIGURA 10)

Tabela 18 – Porcentagem dos fenótipos de subpopulações CD4/CD8 de células iNKT (CD3+, CD14-, CD19-/Vβ11+, Va24+) após diferentes estímulos. As células destacadas evidenciam a população mais abundante em cada condição.

Subpopulações iNKT (CD3+, C D14-CD19Vb11+, Va24+)	Controle Negativo					Esfingomielina					Lyso-PC				
	EoE 1	EoE 2	EoE 3	Controle	Média	EoE 1	EoE 2	EoE 3	Controle	Média	EoE 1	EoE 2	EoE 3	Controle	Média
CD4-, CD8- (%) <i>NKT1</i>	60,71	73,17	45,45	55,00	58,58	12,05	25,41	29,87	33,11	25,11	1 8,77	22,62	31,49	34,24	26,78
CD4+, CD8- (%) <i>NKT1/2</i>	25,00	19,51	46,21	37,08	31,95	84,66	71,04	47,40	61,38	66,12	76,41	74,56	27,01	62,88	60,22
CD4-, CD8+ (%)	12,50	7,32	7,58	7,92	8,83	2,19	3,00	16,88	4,80	6,72	3,22	2,10	35,82	2,46	10,90
CD4+, CD8+ (%)	1,79	0,00	0,76	0,00	0,64	1,10	0,56	5,84	0,71	2,05	1,61	0,71	5,67	0,41	2,10
Subpopulações iNKT (CD3+, CD14-CD19-/Vb11+, Va24+)	Leite Integral UHT					Leite Desnatado UHT					Leite Integral Pasteurizado				
	EoE 1	EoE 2	EoE 3	Controle	Média	EoE 1	EoE 2	EoE 3	Controle	Média	EoE 1	EoE 2	EoE 3	Controle	Média
CD4-, CD8- (%) <i>iNKT 1</i>	33,33	14,68	71,95	37,35	39,33	54,29	13,95	73,05	51,77	48,26	58,33	16,36	57,08	37,31	42,27
CD4+, CD8- (%) <i>iNKT 1/2</i>	6 6,67	83,77	15,01	58,28	55,93	37,14	85,09	4,01	44,02	42,57	41,67	81,78	13,72	55,07	48,06
CD4-, CD8+ (%)	0,00	0,74	11,90	3,77	4,10	5,71	0,80	22,63	3,73	8,22	0,00	1,87	25,22	5,21	8,07
CD4+, CD8+ (%)	0,00	0,82	1,13	0,60	0,64	2,86	0,16	0,31	0,48	0,95	0,00	0,00	3,98	2,42	1,60

Tabela 19 – Porcentagem dos fenótipos de subpopulações de células iNKT (CD3+, CD14-, CD19-/CD1d+) após diferentes estímulos em relação ao marcador CD161.

CD3+, CD14- CD19-/CD1d+	Controle Negativo					Esfingomielina					Lyso-PC				
	EoE 1	EoE 2	EoE 3	Controle	Média	EoE 1	EoE 2	EoE 3	Controle	Média	EoE 1	EoE 2	EoE 3	Controle	Média
CD161+ (%)	1,75	11,56	21,48	6,32	10,27	12,44	11,49	19,02	49,78	23,18	6,85	13,36	21,65	44,25	21,53
CD161- (%)	98,25	88,44	78,52	93,68	89,73	87,56	88,51	80,98	50,22	76,82	93,15	86,64	78,35	55,75	78,47
CD3+, CD14- CD19-/CD1d+	Leite Integral UHT					Leite Desnatado UHT					Leite Integral Pasteurizado				
	EoE 1	EoE 2	EoE 3	Controle	Média	EoE 1	EoE 2	EoE 3	Controle	Média	EoE 1	EoE 2	EoE 3	Controle	Média
CD161+ (%)	6,77	29,00	28,17	22,21	21,54	6,27	27,47	26,24	29,32	22,33	1,53	17,90	19,96	11,39	12,69
CD161- (%)	93,23	71,00	71,83	77,79	78,46	93,73	72,53	73,76	70,68	77,67	98,47	82,10	80,04	88,61	87,31

Figura 11 – Subpopulações de células iNKT frente os diferentes estímulos testados.

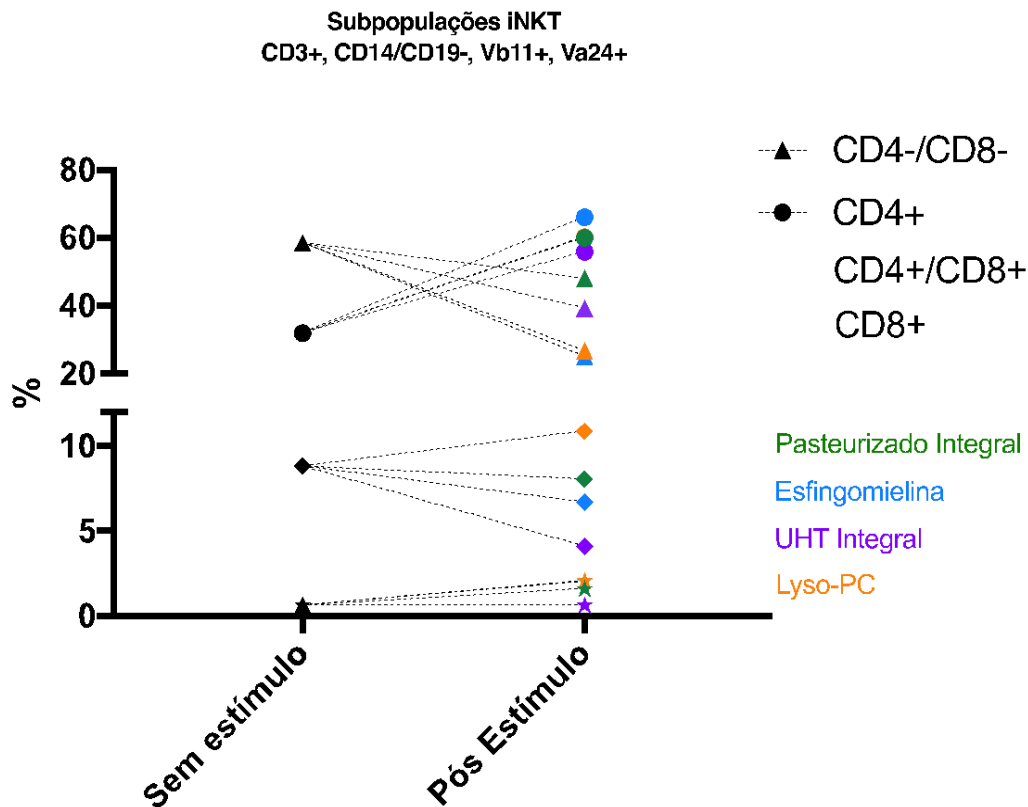
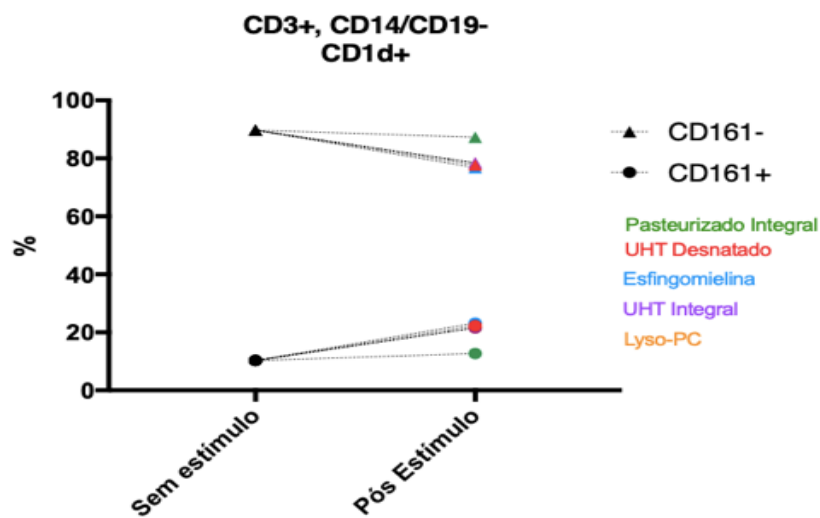


Figura 12 – Subpopulações das células iNKT em relação aos marcadores CD1d e CD61 frente os diferentes estímulos.



Já para as populações considerando a presença do marcador CD161 nota-se que a população CD161- é maior em todas as condições, indicando que a maior subpopulação pode ser do tipo NKT2 ou NKT17. (FIGURA 12). Entretanto, apesar da população CD161- ser maior, a população CD161+ foi a que mais expandiu perante os estímulos, chegando a dobrar sua expressão, demonstrando que mesmo em menor quantidade, também houve expansão de NKT1.

5 DISCUSSÃO

O processo de seleção de pacientes do grupo principal, ou seja, EoE sem sensibilização para leite de vaca, demandou um grande esforço conjunto de todo o time do ambulatório de Esofagite Eosinofílica e Alergia Alimentar, visto que é um grupo bastante raro. Já que a EoE é uma doença onde existe uma quebra de barreira epitelial esofágica, favorecendo a maior apresentação de antígenos alimentares e levando a múltiplas sensibilizações (34). É importante ressaltar que o presente estudo impulsionou a implantação de protocolos de atendimento e metodologia diagnóstica utilizada atualmente no ambulatório de EoE do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Escolhemos o grupo EoE não sensibilizados ao leite de vaca, para evitar erros na interpretação das citocinas mais importantes na fisiopatologia da EoE, já que mesmo sendo a EoE uma doença de mecanismo misto (IgE e não IgE mediada) (21) a presença da IgE específica para leite de vaca e frações poderia estar alterada nos pacientes sensibilizados a estas proteínas.

Em relação ao perfil de sensibilização para o leite de vaca, foram preenchidos todos os critérios estabelecidos inicialmente nesta pesquisa. Foi muito interessante encontrar que alguns indivíduos com EoE sem APLV IgE mediada, apresentaram IgG4 específica para as frações do leite (caseína, alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina). Vários estudos têm mostrado que os pacientes com EoE tem níveis anormalmente elevados de IgG4 total no sangue periférico e níveis aumentados de IgG4 específica para os alimentos mais relacionados a piora da EoE como são leite de vaca, ovo e trigo (65,66). O papel da IgG4 específica para o leite de vaca nos pacientes com EoE ainda não este claro.

De acordo ao estudo anatomopatológico, o critério histológico mais importante é a presença de ≥ 15 eosinófilos por campo de grande aumento (CGA), não se considerando outras alterações histológicas para o diagnóstico de EoE (8). As médias do escore EoEHSS foram estatisticamente diferentes entre os grupos “Controle versus EoE” e “Controle versus EoE+APLV. Por outro lado, não houve diferença entre os grupos “Controle versus APLV, indicando que os parâmetros de análise são suficientes para distinguir EoE com ou sem a presença de APLV, apesar do “n” pequeno deste último grupo. Além disso, a presença de APLV não causa alterações histológicas no esôfago semelhantes às desenvolvidas na EoE. Não foi possível estabelecer um valor de cutoff do escore entre o grupo Controle e o grupo EoE.

As mudanças endoscopias vistas nos esôfagos da EoE estão muito bem estabelecidas, sendo úteis para avaliar evolução da doença e progressão para fibroestenose esofágica, tentando classificar essas alterações endoscópicas em três padrões principais: Inflamatório, Misto e Fibroestenótico. (71)

Encontramos que as características endoscópicas da EoE são restritas a essa doença, não estando presente em outros grupos de pacientes como os APLV IgE mediada e participantes do grupo controle com outras doenças atópicas. Dado interessante foi que dentro no grupo com EoE não sensibilizado ao leite de vaca, após 12 semanas de não estar tratando sua EoE o padrão endoscópico mais predominantes foi o inflamatório (no 50% dos participantes deste grupo), mostrando que a EoE é uma doença inflamatório crônica e evolutiva que apresenta a capacidade de progressão para remodelamento do tecido esofágico e fibroestenose ao longo do tempo. (72)

No grupo de 16 pacientes com EoE apenas 1 paciente correspondente ao 6.5% não apresentava nenhuma característica endoscópica, mesmo após 12 semanas de não estar tratando a sua doença, isto é, devido a que entre o 10 – 20% dos pacientes com EoE apresentam uma aparência endoscópica normal do esôfago. (73)

De acordo aos dados apresentados da cultura de células nas amostras congeladas, de forma geral houve uma discreta expansão da população de células iNKT com uma média de 0.20%, frente os estímulos quando comparadas ao não estimulado, sem estímulo, chegando a cerca de 10% para algumas amostras, com as medianas conforme mostrado na tabela 17.

De acordo a dosagem de citocinas a partir de estímulo com diferentes lipídeos com o Luminex foi observado que Eotaxina 1/CCL11 foi a quimiocina mais estimulada que chegou a ter um aumento de 9 vezes em relação à expressão basal para um indivíduo, não havendo diferença entre esfingomielina e Lyso-PC, ou entre controles e doentes (figura 6). Embora RANTES fosse a quimiocina mais abundante detectada no soro circulante mesmo sem estímulo, não houve praticamente aumento de sua expressão após estímulo com os lipídeos (tabela 21).

Quando analisamos as citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL5 e IL13) foi interessante ressaltar que a citocina que teve maior aumento de expressão pós estímulo foi a IL-4, em 50% das amostras, mas muito acentuadamente na amostra dos indivíduos EoE+APLV, tendo sido um aumento de 8 vezes a expressão quando comparado ao nível basal após estímulo com esfingomielina, sendo ainda o aumento frente ao Lyso-PC o dobro, cerca de 17 vezes (figura 8).

Lembrando que este grupo de paciente poderia apresentar maior expressão da IL-4 pela própria APLV IgE mediada.

Segundo os dados desta análise do Luminex é importante destacar que não houve diferença entre os estímulos com esfingomielina, cujo envolvimento na EoE já está relatado na literatura (24), e Lyso-PC, mas este último está presente em uma concentração 10 vezes maior nos leites.

Quando observamos a cultura de células com diferentes estímulos em amostras de PBMC frescas encontramos que as células mantidas em cultura sem estímulo não proliferaram, e a população de células iNKT se manteve em uma média de 0,20%, conforme o esperado, já que esse tipo celular compreende apenas 0,01-1% das PBMCs. Em contraste, houve grande expansão destas células frente a todos os estímulos testados. Para melhor visualização da expansão foi calculada a razão do número de células antes e após estímulo mostrado na figura 9.

Embora tenha ocorrido a proliferação de células iNKT com todos os estímulos em todas as amostras, a quantidade destas células em indivíduos com EoE se mantém consideravelmente menor em relação à amostra controle. Um estudo mostrou que crianças com EoE ativa comparadas a um grupo com EoE controlada ou sem EoE, possuem menos iNKT circulantes, devido ao fato de que quando ativadas migram para o sítio de inflamação, comprovado nesse mesmo estudo devido aos altos níveis de iNKTs encontradas em biópsias de esôfago de crianças com EoE ativa (74).

Ao observar a expansão de nossas subpopulações, nota-se que as células iNKTCD4+ tiveram expansão maior, ultrapassando a população

iNKTCD4-CD8- que era dominante no estado basal, com todos os estímulos testados (Tabela 22 e Figura 11).

Estudos demonstram que a esfingomielina é um dos principais antígenos lipídicos, capaz de ativar e expandir células iNKT(75)

Pela primeira vez foi testado o efeito do lipídeo Lyso-PC devido à sua presença 10 vezes maior no leite integral UHT do que no leite integral pasteurizado. Nossos resultados mostram que esse lipídeo provocou maior proliferação destas células do que a esfingomielina.

Em relação aos leites, o leite integral UHT provocou maior proliferação de células iNKT quando comparado ao leite integral pasteurizado. No presente estudo o lipídeo Lyso-PC induziu a maior expansão de iNKT dentre todos os estímulos testados, enquanto o leite pasteurizado foi o que menos induziu a expansão de iNKT.

Sabe-se que o Lyso-PC é reconhecido pelas iNKT através da molécula CD1d, e que seu reconhecimento leva à uma resposta inflamatória, podendo então estar agindo como um recrutador destas células para o tecido esofágico na EoE ativa que estão ingerindo leite UHT

É reportado que Lyso-PC e esfingomielina são capazes de estimular tanto células NKT1 como NKT2 (76), entretanto, em nossos resultados (Tabela 8) e já descrito na literatura, o Lyso-PC tende a ativar mais células NKT2, demonstrando ser um potente antígeno para essa subpopulação (77).

Diante de nossos resultados abre-se uma possibilidade de conexão entre a prevalência mais elevada de desenvolvimento de EoE em nosso meio e o consumo de leite integral UHT, independentemente de ALV, já que tanto em

indivíduos com EoE como em indivíduos saudáveis, a proliferação de iNKT foi maior quando estimulada por esse tipo de leite.

Com base nos resultados, podemos inferir que a maior proliferação de iNKT se deu nas subpopulações NKT2 e/ou NKT17, e confirmar que dentre os estímulos testados, o Lyso-PC promoveu a maior expansão destas células. Ainda assim, novos experimentos com dosagens de citocinas específicas são necessários para caracterizar e diferenciar essas subpopulações.

As análises realizadas, mesmo com N pequeno, indicam que o Lyso-PC, lipídeo que está dez vezes mais expresso no leite integral UHT em relação ao leite integral pasteurizado, tem potencial de causar maior proliferação de células iNKT do que a esfingomielina, utilizada como referência para proliferação de células INKT. Logo, abre-se uma perspectiva de estudos futuros para avaliar se o consumo de leite integral UHT favorece o desenvolvimento de EoE e estaria relacionado com a alta prevalência da doença observada em nosso meio.

6 CONCLUSÕES

A padronização de cultura para expansão de células iNKT frente a diferentes estímulos foi realizada com sucesso, chegando às seguintes concentrações/volumes finais: esfingomielina 250 ng/ml; Lyso-PC 250 ng/ml; leite integral UHT, desnatado UHT e integral pasteurizado 125 µl.

Existem dados na literatura que não conseguimos reproduzir devido ao número insuficiente de células teciduais esofágicas para começar os experimentos que não permitiram avaliar o papel da iNKT no esôfago dos pacientes com EoE.

Mostramos que o lipídeo Lyso-PC, que se encontra 10 vezes mais expresso no leite UHT do que no leite pasteurizado, quando utilizado como estímulo na mesma concentração que a esfingomielina teve igual potencial de induzir expansão de células iNKT, lipídeo já relatado como importante na patogênese da EoE.

Quando comparamos os leites UHT e pasteurizado como estímulos em amostras de células frescas de indivíduos com EoE e indivíduo controle saudável, observamos que o leite UHT promoveu maior expansão de células do que o leite pasteurizado.

As análises das subpopulações de iNKT mostraram que as subpopulações mais presentes foram do tipo NKT2 e/ou NKT17. O lipídeo Lyso-PC promoveu a maior expansão de células iNKT, dentre todos os estímulos testados. Por outro lado, o leite integral UHT promoveu a expansão de 2,5 vezes mais células iNKT do que o leite pasteurizado.

Essas novas informações abrem possibilidades para uma relação entre o alto consumo de leite integral UHT no Brasil e a alta prevalência em nosso meio

de EoE em indivíduos sem ALV, além das altas taxas de desencadeamento de EoE durante OIT com leite de vaca. Análises com um grupo maior de células frescas permitirão avaliar o papel dos leites, diferentemente processados, na patogenia da EoE e o potencial envolvimento dos lipídeos para desenvolvimento dessa doença.

7 ASPECTOS ÉTICOS

A participação de voluntários neste projeto fica condicionada à leitura, compreensão e assinatura de TCLE, e todos serão informados que podem abandonar o estudo a qualquer momento, sem que os seus direitos à assistência médica e demais cuidados de saúde na instituição sejam prejudicados. Os voluntários não serão submetidos a qualquer forma de intervenção experimental envolvendo drogas ou vacinas. Os riscos a que os voluntários estarão submetidos são baixos. Há os riscos inerentes a endoscopia digestiva alta com biopsias de tecido e à punção venosa, que raramente podem causar dor, hiperemia local ou um pequeno hematoma. O início deste estudo será após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), atualmente o projeto já foi aceito pelo comitê de ética em pesquisa. Este projeto também foi aprovado pelo comitê de ética do departamento de Gastroenterologia Clínica HCFMUSP.



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Ação da Esfingomiulina do Leite de Vaca sobre os Linfócitos T Natural Killer Invariantes de Pacientes com Esofagite Eosinofílica Não Sensibilizados ao Leite de Vaca

Pesquisador: Fábio Fernandes Morato Castro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57513316.4.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.733.889

Apresentação do Projeto:

Trata-se da alteração de vigência do tempo do estudo, a qual foi estendida para 4 anos em virtude da transferência do aluno de Mestrado para o Doutorado Direto. Não houve outras alterações no protocolo do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a resposta das células INKT ao leite de vaca em pacientes não sensibilizados ao leite de vaca com Esofagite Eosinofílica, no sangue periférico e na biópsia de tecido do esôfago.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há alteração nos riscos e benefícios da pesquisa em função do aumento do tempo de estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a declarar.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada a declarar.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelqz.adm@hc.fm.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 1.733.889

SAO PAULO, 19 de Setembro de 2016

Alfredo José Mansur

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 1.733.889

Considerações Finais e critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_780348 E1.pdf	22/08/2016 22:43:38	Pablo Michael Torres Cordova	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	FORMULARIO_SUBMISSAO_DE_EMENDAS_E_BROCHURAS.pdf	22/08/2016 22:38:25	Pablo Michael Torres Cordova	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_COORDENADOR.pdf	22/08/2016 22:37:00	Pablo Michael Torres Cordova	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_PABLO_EMENDA.docx	22/08/2016 22:31:18	Pablo Michael Torres Cordova	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_GRUPO_CONTROLE_EMENDA.doc	22/08/2016 22:30:24	Pablo Michael Torres Cordova	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_FINAL_PACIENTES_EMENDA.doc	22/08/2016 22:30:06	Pablo Michael Torres Cordova	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_GRUPO_CONTROLE.doc	30/06/2016 16:18:55	Pablo Michael Torres Cordova	Aceito
Outros	CADASTRO_ONLINE_ACEITO_CORRIGIDO.pdf	30/06/2016 16:17:40	Pablo Michael Torres Cordova	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_ACEITA.pdf	27/06/2016 14:26:38	Pablo Michael Torres Cordova	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_FINAL_PACIENTES.doc	21/06/2016 23:45:34	Pablo Michael Torres Cordova	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_FINAL_PABLO.docx	15/06/2016 20:02:18	Pablo Michael Torres Cordova	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelqz.adm@hc.fm.usp.br

8 ANEXOS

QUESTIONÁRIO DOS PACIENTES SELECIONADOS

RESPONSÁVEL: PABLO TORRES CÓRDOVA AMBULATÓRIO DE ESOFAGITE EOSINOFÍLICA

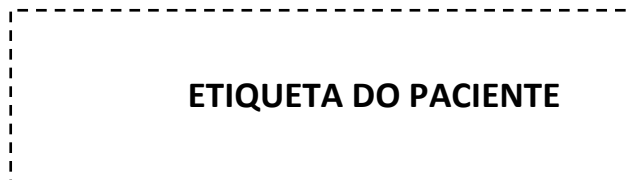
GRUPO DE ESTUDO

GRUPO CONTROLE

TCLE: SIM NÃO

DATA:

TELEFONE:



IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Data de Nascimento:

Lugar de Nascimento

Idade:

Sexo M F

Cidade de Residência:

Tipo de Residência Urbana Rural

Raça Branca Negra Asiático Indígena Parda

Renda mensal:

Escolaridade:

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Crítérios de Inclusão

Diagnostico confirmado de EoE Sim Não

Sintomas de Disfunção Esofagiana Sim Não

EDA com Biopsias com características macroscópicas e infiltrado de ≥ 15 eosinófilos por CGA Sim Não

Persistência dos sintomas e infiltrado eosinofílico após 8 semanas de doses altas de IBP Sim Não

Pacientes sem sensibilização IgE para LV e frações do leite Sim Não

Critérios de Exclusão

Outras causas de eosinofilia esofagiana Sim Não

Alguma imunodeficiência primária Sim Não

Doenças infecciosas Sim Não

Doenças Autoimunes Sim Não

Neoplasias- Malignidade Sim Não

Cirurgia do esôfago há menos de 6 meses Sim Não

Atualmente em imunoterapia alérgica específica Sim Não

Gravidez Sim Não

Analfabetismo Sim Não

Ausência de concordância do TCLE Sim Não

Sensibilização IgE específica para leite de vaca e frações Sim Não

HISTÓRIA MÉDICA

Local de Parto Casa Hospital Outro:

Tipo de Parto Normal Cesariana Desconhece

Idade Gestacional: Pre-termo (< 37 sem) Termo (37 – 41 sem) Pos-termo (>41 sem) Desconhece

Leite de Fórmula na maternidade: Sim Não Desconhece

Aleitamento Materno exclusivo: Sim Não Desconhece.

Até que Idade (meses) _____

História Pessoal de Atopia Sim Não

Tipo de Atopia: Asma Rinite Dermatite Atópica

Outros _____

Data de Início: Asma _____ Rinite _____

Dermatite Atópica _____

Outros _____

História Familiar de Atopia Sim Não

Pai _____ Mãe _____ Irmão _____ Irmã _____

Tem filhos Sim Não

Quantos _____

Alergia alimentar Sim Não - Diagnóstico confirmado? Sim Não

Quantas refeições faz por dia _____

Horário das mesmas _____

Bebe líquido com as Refeições Sempre Quase sempre Às vezes Nunca

Quantos copos de Água/Líquido toma por dia com as refeições _____

Quantos copos de líquido tomam por dia fora refeições _____

Evita algum alimento Sim Não

Quais _____

Porque _____

Que tipo de Leite toma atualmente? Integral Desnatada Semidesnatada Sem Lactose

Não Toma

Prefere comer alimentos líquidos e pastosos Sim Não

Por Exemplo _____

Porque _____

Come devagar Sim Não Desconhece

Tem plenitude gástrica precoce Sim Não Desconhece

Que alimentos come sem problemas _____

Que gosta de comer _____

Que alimentos não gosta de comer _____

Porque _____

Corta os alimentos em pequenos pedaços Sim Não

Evita ingerir comprimidos grandes Sim Não

Evita alimentos difíceis de engolir como carne e pão Sim Não

Tem medo de comer em público Sim Não

Fica preocupado quando vai comer Sim Não

Tem tosse durante ou após refeições Sim Não

Explicar _____

Tem engasgos durante ou após refeições Sim Não

Explicar _____

DADOS DA EOE

Primeira Consulta Sim Não

Data de início/sintomas _____

Data do Diagnóstico/EoE _____

Data de Início/TTO _____

Tratamento Atual Corticóide Deglutido IBP

Doses _____

Tem dificuldade de ganho de peso Sim Não

Tem dificuldade de perda de peso Sim Não

Ganhou peso após início do TTO da EoE? Sim Não Quanto peso? _____

Faz exclusão alimentar Sim Não

Tipo de Dieta

Elementar SFD (Six Food Diet) Dirigida por TC Dirigida por TC + Leite Por contra própria

Alimentos em Exclusão

Fez dilatação de Esôfago

Sim Não Quantas vezes _____

Familiares com EoE Sim Não Pai Mãe Irmão Irmã Desconhece

Familiares com sintomas de Disfunção Esofagiana Sim Não Pai Mãe Irmão Irmã

Desconhece

Que sintomas sente pela EoE

Dificuldade para comer Náuseas Vômitos Azia Insuficiência de Crescimento Desnutrição

Disfagia Impactação Engasgos Sintomas de Refluxo Crônico Dor no Peito

Mal-estar geral Cansaço Sintoma após atividade física. Qual _____

Sialorreia Dor de Garganta Soluços Inapetência Tosse quando come Inapetência

Tosse durante refeição

Sente algum dos sintomas imediatamente após comer Sim Não Desconhece

Quanto tempo _____

Com que alimentos

Sente sintomas após várias horas/dias de comer

Sim Não Desconhece Quanto tempo _____

Tem ido ao PS após comer pela EoE

Sim Não Quantas vezes _____ TTO _____

ENDOSCOPIAS

Data de Primeira EDA ____/____/____ Idade _____

Data de Última EDA ____/____/____ Idade _____

Quantas EDA têm realizado

ÚLTIMA EDA + BIOPSIAS:

Quadro Clínico na semana da EDA

Intercorrências durante ou após EDA

Sim Não Qual _____

Paciente em uso de IBP Sim Não

Doses

Paciente usou Corticoide deglutido nos últimos 3 meses antes da EDA Sim Não

Paciente em Jejum Sim Não

Paciente excluindo algum alimento

Sim Não – Que alimentos

Quantas Biopsias foram feitas

Lugares das Biopsias

Proximal Médio Distal Outro _____

Estomago Duodeno

Pesquisa de H. Pylori Sim Não

Eosinófilos por CGA

MACROSCOPIA: _____

MICROSCOPIA _____

EXAMES LABORATORIAIS E DIAGNOSTICOS

Testes Cutâneos de Hipersensibilidade Imediata. Data ____/____/____

Prick to Prick in natura Sim Não - Resultado Positivo Negativo

Alimentos Leite Ovo clara Ovo gema Trigo Soja Milho Mandioca Amendoim Peixe

Camarão

Outros _____

Alimentos Positivos Leite () Ovo () Trigo () Soja () Milho () Mandioca

() Amendoim () Peixe () Camarão ()

Outros _____

Alimentos Negativos Leite Ovo Trigo Soja Milho Mandioca Amendoim Peixe Camarão

Outros _____

Histamina ()

Controle Negativo()

Testes Cutâneos de Hipersensibilidade Tardia - Data ____/____/____

Patch Test Sim Não Resultado Positivo Negativo

Alimentos Leite Ovo Trigo Soja Milho Mandioca Amendoim Peixe Camarão

Outros _____

Positivos Leite () Ovo () Trigo () Soja () Milho ()

Mandioca () Amendoim () Peixe () Camarão ()

Outros _____

Negativos Leite Ovo Trigo Soja Milho Mandioca Amendoim Peixe Camarão

Outros _____

LABORATORIO

Eosinófilos _____ Data ____/____/____

VHS _____ Data ____/____/____

PCR _____ Data ____/____/____

IgE Total _____ Data ____/____/____

IgE específica LV _____ Data ____/____/____

Alfa lactoalbumina _____ Data ____/____/____

Beta lactoglobulina _____ Data ____/____/____

Caseína _____ Data ____/____/____

DPT _____ Data ____/____/____

Blomia _____ Data ____/____/____

DF _____ Data ____ / ____ / ____

Cortisol sérico _____ Data ____ / ____ / ____

H. Pylori _____ Data ____ / ____ / ____

TCLE PACIENTES GRUPO DE ESTUDO

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA: AÇÃO DA ESFINGOMIELINA DO LEITE DE VACA SOBRE OS LINFÓCITOS T
NATURAL KILLER INVARIANTES DE PACIENTES COM ESOFAGITE EOSINOFÍLICA NÃO
SENSIBILIZADOS AO LEITE DE VACA.

PESQUISADOR PRINCIPAL: Pablo Michael Torres Córdova.

CARGO/FUNÇÃO: Médico pós-graduando do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Instituto Central
do Hospital Das Clínicas da FMUSP (ICHC- FMUSP).

DEPARTAMENTO/INSTITUTO: Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fabio Fernandes Morato Castro.

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO X
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

DURAÇÃO DA PESQUISA: Quatro anos.

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

CONVITE PARA PARTICIPAR NO ESTUDO

Você ou seu filho (a) está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa pelo fato de ter uma doença chamada Esofagite Eosinofílica.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO

A esofagite eosinofílica é uma doença do esôfago que tem mostrado relação importante com o leite de vaca. Nosso objetivo é saber o que faz o leite de vaca no esôfago das pessoas que tem esofagite eosinofílica.

PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS E MÉTODOS QUE SERÃO EMPREGADOS

Endoscopia Digestiva Alta após sedação através de medicamento administrado pela veia, o paciente dorme e um tubo com câmara na ponta é introduzido através da boca do paciente, passa pelo esôfago, estômago e começo do intestino. Biópsias (mínimos pedacinhos) são retiradas desses 3 lugares para depois serem analisadas através do microscópio. O paciente acorda após o exame e depois de se recuperar da sonolência, não sente dores. Caso seja identificada a suspeita da doença Esofagite Eosinofílica, será necessário o início de tratamento com medicamentos como bloqueadores de ácidos gástricos, via oral, por 8 a 12 semanas e, após nova endoscopia, se ainda houver alterações no exame, será necessário tratamento com corticoide engolido.

Coleta de exame de sangue através de acesso venoso do antebraço para realização de testes que avaliarão a alergia em geral e presença de anticorpos causadores de alergia ao leite de vaca.

Teste cutâneo de alergia para o leite de vaca. Os testes são feitos colocando uma gota do extrato (solução diluída do agente causador de alergia) no seu braço e depois fazendo uma leve picada com uma pequena agulha através desta gota. O resultado é obtido depois de 20 minutos da aplicação.

DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PELA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Endoscopia digestiva alta: o desconforto esperado pode ser devido ao furo da agulha para aplicar sedativo (remédio para dormir) pela veia, antes do exame. Pode ser que após o exame, o paciente fique algumas horas sonolento. O paciente não sente dores após o exame.

Coleta de sangue: desconforto do furo da agulha, e em alguns casos pode ocorrer inchaço, dor, e às vezes pequena mancha arroxeadada no local da picada.

Os testes de alergia para o leite de vaca: podem causar coceira no local da aplicação, vermelhidão e inchaço no local da picada, que podem durar de 30 a 90 minutos. Em casos raros estes testes podem causar reações mais importantes como chiado, problemas para respirar e queda da pressão. Os testes são praticamente indolores, mas podem ser um pouco desconfortáveis.

BENEFÍCIOS PARA O PARTICIPANTE

O principal benefício deste estudo é saber se a exclusão do leite de vaca da dieta do paciente beneficiaria o tratamento de sua doença, a esofagite eosinofílica. Todos os procedimentos serão feitos por profissionais capacitadas e treinadas, em lugares com toda a infraestrutura necessária para garantir a segurança do paciente.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTENCIA PARA OS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Os pacientes que participem do estudo serão acompanhados frequentemente no ambulatório de Alergia Alimentar do serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, durante o estudo, após terminar o estudo e no caso de interrupção do estudo. Se participar do estudo, você será esclarecido de todos os procedimentos que irá fazer, será informado dos riscos e benefícios e a qualquer tempo poderá pedir qualquer informação que desejar.

GARANTIA DE ACESSO

Você terá a plena liberdade de escolher em participar ou não do estudo e de retirar o seu consentimento em qualquer etapa do estudo sem nenhum problema nem penalização alguma, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa e aos profissionais responsáveis para esclarecimento de eventuais dúvidas. Garantimos que você receberá uma via deste termo de consentimento. A participação ou não do estudo depende de você e se decidir participar, deverá assinar esse Termo de Consentimento.

Você é livre para desistir a qualquer momento desse estudo, e se decidir não participar, isto não afetará de nenhuma maneira a qualidade de tratamento que você recebe em nossa Unidade. Você continuará a ter o atendimento com os médicos para orientações.

As informações obtidas serão analisadas e não será divulgado a identificação de nenhum paciente. Se você aceitar participar do 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 sua identidade e/ou a de seu filho não serão reveladas.

VIABILIDADE DE INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS À SAÚDE E DESPESAS DECORRENTES DA PESQUISA

Não há indenização deste procedimento, pois ele não é experimental, já sendo utilizado em outros serviços, sendo realizado apenas com seu consentimento. Não há despesas pessoais para o participante

em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

MATERIAL COLETADO

Os dados e o material coletado (sangue e biópsias do esôfago) que serão usados nesta pesquisa serão armazenados de acordo com a resolução 441/2011. Será pedido um novo consentimento para o caso de uso futuro do material armazenado. Permito a utilização de exames já realizados por mim, em outro momento, com fins diagnóstico, caso possa fazer parte da pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Dr. Pablo Michael Torres Córdova que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 – 8º andar – Bloco 8A, São Paulo-SP, Prédio dos Ambulatórios, secretaria de Imunologia e Alergia Telefone (s) 2661-6098 ou 2661-6225, e-mail: imunodisciplina.ichc@hc.fm.usp.br.

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 – CEP 05403010 São Paulo-SP. Tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “AÇÃO DA ESFINGOMIELINA DO LEITE DE VACA SOBRE OS LINFOCITOS T NATURAL KILLER INVARIANTES DE PACIENTES COM ESOFAGITE EOSINOFILICA NÃO SENSIBILIZADOS AO LEITE DE VACA”

Eu discuti com o Pesquisador Responsável Dr. Pablo Michael Torres Córdova ou pessoa (s) por ele delegada Dra. Ariana Campos Yang sobre a minha decisão em 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 em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador responsável.

----- Data ____ / ____ / ____

Assinatura do paciente/representante legal

----- Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Assinatura da testemunha para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

****(SOMENTE PARA O RESPONSÁVEL DO PROJETO)****

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

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do responsável pelo estudo

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

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPAÇÃO 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(.....)

TCLE PACIENTES GRUPO CONTROLE

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA: AÇÃO DA ESFINGOMIELINA DO LEITE DE VACA SOBRE OS LINFÓCITOS T
NATURAL KILLER INVARIANTES DE PACIENTES COM ESOFAGITE EOSINOFÍLICA NÃO
SENSIBILIZADOS AO LEITE DE VACA.

PESQUISADOR PRINCIPAL: Pablo Michael Torres Córdova.

CARGO/FUNÇÃO: Médico pós-graduando do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Instituto Central
do Hospital Das Clínicas da FMUSP (IHC- FMUSP).

DEPARTAMENTO/INSTITUTO: Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fabio Fernandes Morato Castro.

AValiação DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO X
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

DURAÇÃO DA PESQUISA: Quatro anos.

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

CONVITE PARA PARTICIPAR NO ESTUDO

Você ou seu filho (a) está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa pelo fato de ter concordado em
colaborar com nosso estudo sobre a Esofagite Eosinofílica.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO

A esofagite eosinofílica é uma doença do esôfago que tem mostrado relação importante com o leite de
vaca. Nosso objetivo é saber o que faz o leite de vaca no esôfago das pessoas que tem esofagite
eosinofílica. Por isto, precisamos de pacientes saudáveis como você, que não tenham esta doença.

PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS E MÉTODOS QUE SERÃO EMPREGADOS

Endoscopia Digestiva Alta após sedação através de medicamento administrado pela veia, o paciente dorme e um tubo com câmara na ponta é introduzido através da boca do paciente, passa pelo esôfago, estômago e começo do intestino. Biópsias (mínimos pedacinhos) são retiradas desses 3 lugares para depois serem analisadas através do microscópio. O paciente acorda após o exame e depois de se recuperar da sonolência, não sente dores. Caso seja identificada a suspeita da doença Esofagite Eosinofílica, será necessário o início de tratamento com medicamentos como bloqueadores de ácidos gástricos, via oral, por 8 a 12 semanas e, após nova endoscopia, se ainda houver alterações no exame, será necessário tratamento com corticoide engolido.

Coleta de exame de sangue através de acesso venoso do antebraço para realização de testes que avaliarão a alergia em geral e presença de anticorpos causadores de alergia ao leite de vaca.

Teste cutâneo de alergia para o leite de vaca. Os testes são feitos colocando uma gota do extrato (solução diluída do agente causador de alergia) no seu braço e depois fazendo uma leve picada com uma pequena agulha através desta gota. O resultado é obtido depois de 20 minutos da aplicação.

DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PELA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Endoscopia digestiva alta: o desconforto esperado pode ser devido ao furo da agulha para aplicar sedativo (remédio para dormir) pela veia, antes do exame. Pode ser que após o exame, o paciente fique algumas horas sonolento. O paciente não sente dores após o exame.

Coleta de sangue: desconforto do furo da agulha, e em alguns casos pode ocorrer inchaço, dor, e às vezes pequena mancha arroxeadada no local da picada.

Os testes de alergia podem causar coceira no local da aplicação, vermelhidão e inchaço no local da picada, que podem durar de 30 a 90 minutos. Em casos raros estes testes podem causar reações mais importantes como chiado, problemas para respirar e queda da pressão. Os testes são praticamente indolores, mas podem ser um pouco desconfortáveis.

BENEFÍCIOS PARA O PARTICIPANTE

O principal benefício deste estudo é saber se a exclusão do leite de vaca na dieta do paciente com esofagite eosinofílica beneficiaria o tratamento da doença. Outro benefício importante é ter a satisfação pessoal de colaborar com a investigação desta doença que pode acometer a crianças e adultos.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTENCIA PARA OS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Os pacientes que participem do estudo serão acompanhados frequentemente no ambulatório de Alergia Alimentar do serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, durante o estudo, após terminar o estudo e no caso de interrupção do estudo. Se participar do estudo, você será esclarecido de todos os procedimentos que irá fazer, será informado dos riscos e benefícios e a qualquer tempo poderá pedir qualquer informação que desejar.

GARANTIA DE ACESSO

Você terá a plena liberdade de escolher em participar ou não do estudo e de retirar o seu consentimento em qualquer etapa do estudo sem nenhum problema nem penalização alguma, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa e aos profissionais responsáveis para esclarecimento de eventuais dúvidas. Garantimos que você receberá uma via deste termo de consentimento. A participação ou não do estudo depende de você e se decidir participar, deverá assinar esse Termo de Consentimento.

Você é livre para desistir a qualquer momento desse estudo, e se decidir não participar, isto não afetará de nenhuma maneira a qualidade de tratamento que você recebe em nossa Unidade. Você continuará a ter o atendimento com os médicos para orientações.

As informações obtidas serão analisadas e não será divulgado a identificação de nenhum paciente. Se você aceitar participar do 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 sua identidade e/ou a de seu filho não serão reveladas.

VIABILIDADE DE INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS À SAÚDE E DESPESAS DECORRENTES DA PESQUISA

Não há indenização deste procedimento, pois ele não é experimental, já sendo utilizado em outros serviços, sendo realizado apenas com seu consentimento. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

MATERIAL COLETADO

Os dados e o material coletado (sangue e biópsias do esôfago) que serão usados nesta pesquisa serão armazenados de acordo com a resolução 441/2011. Será pedido um novo consentimento para o caso de uso futuro do material armazenado. Permito a utilização de exames já realizados por mim, em outro momento, com fins diagnóstico, caso possa fazer parte da pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Dr. Pablo Michael Torres Córdova que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 – 8º andar – Bloco 8A, São Paulo-SP,

Prédio dos Ambulatórios, secretaria de Imunologia e Alergia Telefone (s) 2661-6098 ou 2661-6225, e-mail: imunodisciplina.ichc@hc.fm.usp.br.

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 – CEP 05403010 São Paulo-SP. Tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “AÇÃO DA ESFINGOMIELINA DO LEITE DE VACA SOBRE OS LINFOCITOS T *NATURAL KILLER* INVARIANTES DE PACIENTES COM ESOFAGITE EOSINOFILICA NÃO SENSIBILIZADOS AO LEITE DE VACA”

Eu discuti com o Pesquisador Responsável Dr. Pablo Michael Torres Córdova ou pessoa (s) por ele delegada Dra. Ariana Campos Yang sobre a minha decisão em 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 em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador responsável.

----- Data ____ / ____ / ____

Assinatura do paciente/representante legal

----- Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Assinatura da testemunha para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*****(SOMENTE PARA O RESPONSÁVEL DO PROJETO)*****

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 Data ____ / ____ / ____

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

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPAÇÃO 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 (.....)

9 REFERÊNCIAS

1. 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(8):587–96.
2. Hide DW, Gyer BM. Cows milk intolerance in Isle of Wight infants. *Br J Clin Pract* 1983;37(9):285–7.
3. Schrandt JJ, van den Bogart JP, Forget PP, et al. Cow's milk protein intolerance in infants under 1 year of age: a prospective epidemiological study. *Eur J Pediatr* 1993;152(8):640–4.
4. Noti M, Wojno EDT, Kim BS, Siracusa MC, Giacomini PR, Nair MG, et al. Thymic stromal lymphopoietin-elicited basophil responses promote eosinophilic esophagitis. *Nat Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;19(8):1005–13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3951204&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Maggadottir SM, Hill DA, Ruyman K, Brown-Whitehorn TF, Cianferoni A, Shuker M, et al. Resolution of acute IgE-mediated allergy with development of eosinophilic esophagitis triggered by the same food. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(5):1487–90.
6. Van Rhijn BD, Vlieg-Boerstra BJ, Versteeg SA, Akkerdaas JH, Van Ree R, Terreehorst I, et al. Evaluation of allergen-microarray-guided dietary intervention as treatment of eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; 2015;136(4):1095–1097e3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.02.038>

7. Ridolo E, De Angelis GL, Dall'Aglio P. Eosinophilic esophagitis after specific oral tolerance induction for egg protein. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2011;106(1):73–4.
8. Alfredo J Lucendo, Javier Molina-Infante, Ángel Arias, Ulrike von Arnim, Albert J Bredenoord, Christian Bussmann, Jorge Amil Dias, Mogens Bove, Jesús González-Cervera, Helen Larsson, Stephan Miehlke, Alexandra Papadopoulou, Joaq and SEA. Guidelines on eosinophilic esophagitis: evidence-based statements and recommendations for diagnosis and management in children and adults. *United Eur Gastroenterol J.* 2017;(January).
9. Arias Angel, Gonzalez-Cervera J, Tenias JM, Lucendo AJ. Efficacy of dietary interventions for inducing histologic remission in patients with eosinophilic esophagitis: A systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* [Internet]. Elsevier, Inc; 2014;146(7):1639–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.006>
10. Spergel JM, Brown-Whitehorn TF, Cianferoni A, Shuker M, Wang ML, Verma R, et al. Identification of causative foods in children with eosinophilic esophagitis treated with an elimination diet. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;130(2):461–467.e5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.021>
11. Bock S a. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics.* 1987;79(5):683–8.
12. Jyonouchi S, Abraham V, Orange JS, Spergel JM, Gober L, Dudek E, et al. Invariant natural killer T cells from children with versus without food allergy exhibit differential responsiveness to milk-derived sphingomyelin. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;128(1):102–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.026>
13. Dellon ES. Epidemiology of eosinophilic esophagitis. *Gastroenterol Clin North Am.* 2014;43(2):201–18.

14. Straumann A, Bussmann C, Zuber M, Vannini S, Simon HU, Schoepfer A. Eosinophilic Esophagitis: Analysis of Food Impaction and Perforation in 251 Adolescent and Adult Patients. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6(5):598–600.
15. Davis BP, Rothenberg ME. Mechanisms of Disease of Eosinophilic Esophagitis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2016;11(1):365–93. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-012615-044241>
16. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Report of the NIAID-Sponsored Expert Panel. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(6 0):S1-58.
17. Sleiman PMA, Wang M-L, Cianferoni A, Aceves S, Gonsalves N, Nadeau K, et al. GWAS identifies four novel eosinophilic esophagitis loci. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;5:5593. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4238044&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
18. Davis BP. Pathophysiology of Eosinophilic Esophagitis - Gastroenterology. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. Clinical Reviews in Allergy & Immunology; 2018;154(2):333–45. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.06.065>
19. Sherrill JD, Rothenberg ME. Genetic dissection of eosinophilic esophagitis provides insight into disease pathogenesis and treatment strategies. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;128(1):23–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.03.046>
20. Jensen ET, Dellon ES. Environmental factors and eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2018;142(1):32–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.04.015>

21. Alexander ES, Martin LJ, Collins MH, Kottyan LC, Sucharew H, He H, et al. Twin and family studies reveal strong environmental and weaker genetic cues explaining heritability of eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;134(5):1084–1092.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.021>
22. Rochman M, Travers J, Miracle CE, Bedard MC, Wen T, Azouz NP, et al. Profound loss of esophageal tissue differentiation in patients with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(3):738–749.e3.
23. Fillon S, Robinson ZD, Colgan SP, Furuta GT. Epithelial Function in Eosinophilic Gastrointestinal Diseases. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2009;29(1):171–8.
24. Jyonouchi S, Smith CL, Saretta F, Abraham V, Ruymann KR, Modayur-Chandramouleeswaran P, et al. Invariant natural killer T cells in children with eosinophilic esophagitis. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(1):58–68.
25. Lexmond WS, Neves JF, Nurko S, Olszak T, Exley M a, Blumberg RS, et al. Involvement of the iNKT cell pathway is associated with early-onset eosinophilic esophagitis and response to allergen avoidance therapy. *Am J Gastroenterol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;109(5):646–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24513807>
26. Abonia JP, Rothenberg ME. Eosinophilic Esophagitis: Rapidly Advancing Insights. *Annu Rev Med* [Internet]. 2012;63(1):421–34. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-med-041610-134138>
27. Blanchard C, Rothenberg ME. Basic Pathogenesis of Eosinophilic Esophagitis. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2008;18(1):133–43.
28. O'byrne PM, Inman MD, Parameswaran K. The trials and tribulations of IL-5, eosinophils, and allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(4):503–

29. Straumann A, Conus S, Grzonka P, Kita H, Kephart G, Bussmann C, et al. Anti-interleukin-5 antibody treatment (mepolizumab) in active eosinophilic oesophagitis: A randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Gut*. 2010;59(1):21–30.
30. Straumann A, Bauer M, Fischer B, Blaser K, Simon HU. Idiopathic eosinophilic esophagitis is associated with a TH2-type allergic inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(6):954–61.
31. Davies AM, Sutton BJ. Human IgG4: A structural perspective. *Immunol Rev*. 2015;268(1):139–59.
32. Hao M, Liu M, Fan G, Yang X, Li J. Diagnostic Value of Serum IgG4 for IgG4-Related Disease. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2016;95(21):e3785. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201605240-00043>
33. Cheng JY, Zhang T, Ruangwattanapaisarn N. HHS Public Access. 2016;42(2):407–20.
34. Clayton F, Fang JC, Gleich GJ, Lucendo AJ, Olalla JM, Vinson LA, et al. Eosinophilic esophagitis in adults is associated with IgG4 and not mediated by IgE. *Gastroenterology* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;147(3):602–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.05.036>
35. Rothenberg ME, Spergel JM, Sherrill JD, Annaiah K, Martin LJ, Cianferoni A, et al. Common variants at 5q22 associate with pediatric eosinophilic esophagitis. *Nat Genet*. Apr; 42(4):289–91. [PubMed: 20208534]
36. Sherrill JD, Gao PS, Stucke EM, Blanchard C, Collins MH, Putnam PE, et al. Variants of thymic stromal lymphopoietin and its receptor associate with

eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. Jul; 126(1):160–5. e3. [PubMed: 20620568]

37. Bennett LD, Fox JM, Signoret N. Mechanisms regulating chemokine receptor activity. *Immunology*. 2011 Nov; 134(3):246–56. [PubMed: 21977995]

38. Straumann A, Bauer M, Fischer B, Blaser K & Simon HU. Idiopathic eosinophilic esophagitis is associated with a T(H)2-type allergic inflammatory response. *J. Allergy Clin. Immunol*. 108, 954 – 961(2001).

39. Jyonouchi S, Smith CL, Saretta F, Abraham V, Ruymann KR, Modayur-Chandramouleeswaran P, Wang ML, Spergel JM, Cianferoni A (2013) Invariant natural killer T cells in children with eosinophilic esophagitis. *Clin Exp Allergy* 44(1):58–68. <https://doi.org/10.1111/cea.12201>

40. Lexmond WS, Neves JF, Nurko S, Olszak T, Exley MA, Blumberg RS, Fiebiger E (2014) Involvement of the iNKT cell pathway is associated with early-onset eosinophilic esophagitis and response to allergen avoidance therapy. *Am J Gastroenterol* 109(5):646–657. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.12>

41. Abonia JP, Rothenberg ME (2012) Eosinophilic esophagitis: rapidly advancing insights. *Annu Rev Med* 63(1):421–434. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-041610-134138>

42. Safroneeva E, Straumann A, Coslovsky M, Zwahlen M, Kuehni CE, Panczak R, et al. *HHS Public Access*. 2018;150(3):581–90.

43. Lucendo AJ, Sánchez-Cazalilla M. Adult versus pediatric eosinophilic esophagitis: Important differences and similarities for the clinician to understand. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012;8(8):733–45.

44. Lucendo AJ, Arias A, Tenias JM. Relation between eosinophilic esophagitis and oral immunotherapy for food allergy: a systematic review with meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. American College of Allergy, Asthma & Immunology; 2014;113(6):624–9.

45. Kim JS, Nowak-w A, Sicherer SH, Noone S, Moshier EL, Sampson H a. NIH Public Access. 2012;128(1):125–31.
46. Barbosa AC, Castro FM, Meireles PR, Arruda LK, Cardoso SR, Kalil J, et al. Eosinophilic Esophagitis: Latent Disease in Patients with Anaphylactic Reaction to Cow's Milk. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018;6(2):451–456.e1.
47. Hill DA, Dudley JW, Spergel JM. The Prevalence of Eosinophilic Esophagitis in Pediatric Patients with IgE-Mediated Food Allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract* [Internet]. Elsevier Inc; 2017;5(2):369–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaip.2016.11.020>
48. F. Calabi, J. M. Jarvis, L. Martin, C. Milstein. Two classes of CD1 genes. *Eur J Immunol*. 1989 Feb; 19(2): 285–292. doi: 10.1002/eji.1830190211
49. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest*. 2004;114(10):1379–88.
50. Eberl G, Lees R, Smiley ST, Taniguchi M, Grusby MJ, MacDonald HR. Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J Immunol* [Internet]. 1999;162(11):6410–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10352254>
51. Kronenberg M. TOWARD AN UNDERSTANDING OF NKT CELL BIOLOGY: Progress and Paradoxes. *Annu Rev Immunol*. 2005;26:877–900.
52. Exley M, Garcia J, Balk SP, Porcelli S. 1997. Requirements for CD1d recognition by human invariant V α 24+CD4–CD8– T cells. *J. Exp. Med*. 186:109–20
53. Bendelac A, Killeen N, Littman D, Schwartz RH. 1994. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* 263:1774–78

54. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. 1995. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 268:863–65
55. Bendelac A. 1995. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J. Exp. Med.* 182:2091–96
56. Kwon, Dong-il, and You Jeong Lee. "Lineage differentiation program of invariant natural killer T cells." *Immune network* 17.6 (2017): 365-377.
57. Wang, Haiguang, and Kristin A. Hogquist. "How lipid-specific T cells become effectors: the differentiation of iNKT subsets." *Frontiers in immunology* 9 (2018): 1450.
58. Krovi, S Harsha and Laurent Gapin. Invariant Natural Killer T Cell Subsets – More Than Just Developmental Intermediates. *Frontiers in immunology* 9 (2018): 1393.
59. Dashtsoodol, Nyambayar, Sabrina Bortoluzzi, and Marc Schmidt-Supprian. "T Cell Receptor Expression Timing and Signal Strength in the Functional Differentiation of Invariant Natural Killer T Cells." *Frontiers in immunology* 10 (2019)
60. Motta Bioquímica – Cap. 9 lípidios e membranas; 219
61. Rayapudi M, Rajavelu P, Zhu X, et al. Invariant natural killer T-cell neutralization is a possible novel therapy for human eosinophilic esophagitis. *Clinical & Translational Immunology* 2014;3:e9.
62. Zhu X, Wang M, Mavi P, et al. Interleukin-15 expression is increased in human eosinophilic esophagitis and mediates pathogenesis in mice. *Gastroenterology* 2010;139(1):182–93.e7
63. Agea, E., A. Russano, O. Bistoni, R. Mannucci, I. Nicoletti, L. Corazzi, A. D. Postle, L. G. De, S. A. Porcelli, and F. Spinazzi. 2005. Human CD1-restricted T cell recognition of lipids from pollens. *J. Exp. Med.* 202: 295-308

64. Terabe, Masaki, and Jay A. Berzofsky. "The immunoregulatory role of type I and type II NKT cells in cancer and other diseases." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 63.3 (2014): 199-213
65. Vilela D, Alves E, Cesar de Resende J, Bellini Leite J. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. *Política Agrícola* 2017;1:5–24.
66. Fox, Lisa M., et al. "Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes." *PLoS biology* 7.10 (2009).
67. <https://cals.cornell.edu/sites/default/files/202304/pasteurization-fact-sheet-v1.pdf>
68. Kim, H.P.E.S. The Prevalence and Diagnostic Utility of Endoscopic Features of Eosinophilic Esophagitis: A Meta-Analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2012, 10, 988–996.e5. [CrossRef].
69. Hirano, Endoscopic Assessment of the Oesophageal Features of Eosinophilic Oesophagitis: Validation of a Novel Classification and Grading System. *Gut* 2013, 62, 489–495. [CrossRef]
70. Newly developed and validated eosinophilic esophagitis histology scoring system and evidence that it outperforms peak eosinophil count for disease diagnosis and monitoring. M. H. Collins, L. J. Martin, E. S. Alexander, J. Todd Boyd, R. Sheridan, H. He, S. Pentiuik, P. E. Putnam, J. P. Abonia, V. A. Mukkada, J. P. Franciosi, M. E. Rothenberg. *Dis Esophagus*. 2017 Mar; 30(3): 1–8. Published online 2016 Dec
71. Alfredo J. Lucendo, Ángel Arias, Javier Molina-Infante & Laura Arias-González (2017) The role of endoscopy in eosinophilic esophagitis: from diagnosis to therapy, *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 11:12, 1135-1149, DOI: 10.1080/17474124.2017.1367664.

72. Schoepfer AM, Safroneeva E, Bussmann C, et al. Delay in diagnosis of eosinophilic esophagitis increases risk for stricture formation in a time-dependent manner. *Gastroenterology*. 2013;145(6):1230-6.e62. doi:10.1053/j.gastro.2013.08.015
73. Dellon ES, Aderoju A, Woosley JT, et al. Variability in diagnostic criteria for eosinophilic esophagitis: A systematic review. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:2300–13.
74. Jyonouchi, Soma, et al. Invariant natural killer T cells in children with eosinophilic esophagitis. *Clinical & Experimental Allergy* 44.1 (2014): 58-68.
75. Jyonouchi, Soma, et al. Invariant natural killer T cells from children with versus without food allergy exhibit differential responsiveness to milk-derived sphingomyelin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128.1 (2011): 102-109.
76. Terabe, Masaki, and Jay A. Berzofsky. "The immunoregulatory role of type I and type II NKT cells in cancer and other diseases." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 63.3 (2014): 199-213.
77. Macho-Fernandez, Elodie, and Manfred Brigl. "The extended family of CD1d-restricted NKT cells: sifting through a mixed bag of TCRs, antigens, and functions." *Frontiers in immunology* 6 (2015): 362.