



CELSO EDUARDO OLIVIER

ESTUDO SOBRE A IMUNORREATIVIDADE CONTRA A
BETA-LACTOGLOBULINA BOVINA NATIVA E
POLIMERIZADA EM CRIANÇAS E ADULTOS ALÉRGICOS
E/OU INTOLERANTES AO LEITE DE VACA

*STUDY ABOUT THE IMMUNOREACTIVITY AGAINST
NATIVE AND POLYMERIZED BOVINE BETA-
LACTOGLOBULIN IN CHILDREN AND ADULTS WITH
ALLERGY AND/OR INTOLERANCE TO COW'S MILK*

CAMPINAS, 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

CELSO EDUARDO OLIVIER

**ESTUDO SOBRE A IMUNORREATIVIDADE CONTRA A
BETA-LACTOGLOBULINA BOVINA NATIVA E
POLIMERIZADA EM CRIANÇAS E ADULTOS ALÉRGICOS
E/OU INTOLERANTES AO LEITE DE VACA**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

***STUDY ABOUT THE IMMUNOREACTIVITY AGAINST
NATIVE AND POLYMERIZED BOVINE BETA-
LACTOGLOBULIN IN CHILDREN AND ADULTS WITH
ALLERGY AND/OR INTOLERANCE TO COW'S MILK***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

Doctorate Thesis presented to the Medical Postgraduation Programm of the Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Medical Sciences.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO CELSO EDUARDO OLIVIER E ORIENTADA
PELO PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER.

Assinatura do Orientador

Campinas
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

OL4e Olivier, Celso Eduardo, 1963 -
Estudo sobre a imunorreatividade contra a beta –
lactoglobulina bovina nativa e polimerizada em crianças
e adultos alérgicos e / ou intolerantes ao leite de vaca /
Celso Eduardo Olivier. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Ricardo de Lima Zollner.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Alergia. 2. Hipersensibilidade alimentar. 3.
Laticínios. 4. Imunoglobulina E. 5. Reação de Imuno -
aderência. I. Zollner, Ricardo de Lima. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Olivier, Celso Eduardo, 1963 -

OL4e Estudo sobre a imunorreatividade contra a beta –lactoglobulina bovina nativa e polimerizada em crianças e adultos alérgicos e / ou intolerantes ao leite de vaca / Celso Eduardo Olivier. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Ricardo de Lima Zollner.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Alergia. 2. Hipersensibilidade alimentar. 3. Laticínios. 4. Imunoglobulina E. 5. Reação de Imuno - aderência. I. Zollner, Ricardo de Lima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Study about the immunoreactivity against native and polymerized bovine beta-lactoglobulin in children and adults allergic and/or intolerant to cow's milk.

Palavras-chave em inglês:

Allergy

Food hypersensitivity

Dairy products

Immunoglobulin E

Immune adherence reaction

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora:

Ricardo de Lima Zollner [Orientador]

Ariana Campos Yang

Ana Paula Beltran Moschione Castro

Maria Marluce dos Santos Vilela

Edgard Ferro Collares

Data da defesa: 05-07-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da tese de Doutorado

Celso Eduardo Olivier

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Ariana Campos Yang

2. Prof^a. Dr^a. Ana Paula Beltran Moschione Castro

3. Prof^a. Dr^a. Maria Marluce dos Santos Vilela

4. Prof. Dr. Edgard Ferro Coares

5. Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 05/07/2012

DEDICATÓRIA

*À meu pai, Wladimir Olivier (in memoriam),
que também foi responsável por esta obra,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao Criador dos criadores, pela obra maravilhosa que tem feito em nossas vidas.

À minha família, por continuar a me incentivar a caminhar.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo, exemplo e formação.

Aos meus mestres, por me fazerem o que sou.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, pela sabedoria e fonte de inspiração na condução deste discípulo.

Às minhas assistentes e orientandas: Regiane Patussi dos Santos Lima, Raquel Acácia Pereira Gonçalves dos Santos, Daiana Guedes Pinto, Grayce Katlen Moreno da Silva e Mariana Dias da Silva, que não mediram esforços na colaboração com este projeto.

À equipe do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental e em especial à Dr^a Conceição Aparecida Vilella pelas instruções valiosas e pelo apoio fundamental.

À equipe da Faculdade de Engenharia de Alimentos: Prof^a. Dr^a Flávia Maria Netto, M^s Mariana Battaglin Villas Boas e M^s Michele Augusto Fernandes cuja colaboração foi essencial para a execução deste trabalho.

À equipe do Gastrocentro, Prof^a. Dr^a Sônia Letícia Silva Lorena e Célia Regina Pavan pelo encaminhamento dos pacientes e pela realização dos testes de Hidrogênio expirado.

Aos pacientes participantes deste estudo, pela colaboração e confiança em nós depositada.

*"On comprend qu'aux époques de transition les traités dogmatiques soient difficiles, parce qu'un ouvrage est déjà vieux avant d'être achevé, et qu'une doctrine court risque d'être renversée avant d'avoir été entièrement formulée. Dans un certain nombre d'années, lorsque cette sorte de fermentation scientifique aura subi son évolution, et que le temps aura mûri les résultats de l'expérimentation, on pourra seulement réunir les conquêtes modernes de la science et les relier par les principes ou les lois qui découleront de leur rapprochement."*¹



Claude Bernard, Paris, 1855¹

¹Compreende-se que durante as épocas de transição, os tratados dogmáticos sejam difíceis, porque uma obra já está velha antes mesmo de estar acabada, e uma doutrina corre o risco de ser desqualificada, antes mesmo de estar inteiramente formulada. Dentro de certo número de anos, quando esta espécie de fermentação científica tenha atingido o cume de sua evolução, e quando o tempo houver amadurecido os resultados da experimentação, poder-se-á reunir as conquistas modernas da ciência, para as retermos por seus princípios ou pelas leis provenientes de sua harmonização.

RESUMO

A alergia ao leite de vaca é uma condição, até o momento, sem uma solução satisfatória. Dentre as proteínas do leite, a beta-lactoglobulina é uma das mais alergênicas pelo fato de não ser produzida pelo ser humano e sua pouca digestibilidade, mas pouco se sabe sobre a alergenicidade das proteínas bioprocessadas pela indústria de laticínios como a beta-lactoglobulina polimerizada.

O objetivo deste trabalho é estudar imunorreatividade da beta-lactoglobulina polimerizada e compará-la com a beta-lactoglobulina nativa. Utilizou-se a polimerização induzida pela transglutaminase em presença de cisteína e a polimerização induzida pelo aquecimento.

Cinco grupos de pacientes (dois grupos intolerantes e três grupos tolerantes) provenientes de duas clínicas de características distintas foram estudados segundo a apresentação dos sintomas e submetidos a testes cutâneo-alérgicos e a ensaios analíticos para pesquisa de IgE específica contra a beta-lactoglobulina, assim como avaliação da imunorreatividade mediada por células por testes de enfrentamento *ex vivo*, monitorados por testes de inibição da aderência leucocitária .

Foram realizados testes cutâneos pareados com beta-lactoglobulina nativa e polimerizada em 56 adultos com hipersensibilidade problemática ao leite de vaca previamente diagnosticados como intolerantes à lactose. Realizou-se pesquisa de IgE específica contra a beta-lactoglobulina por ImmunoCAP e imunoblote. Um grupo de 20 indivíduos tolerantes ao leite de vaca e com ausência de IgE contra beta-lactoglobulina detectável por ImmunoCAP e testes cutâneo-alérgicos negativos foram selecionados como controle da técnica do imunoblote.

Os resultados mostraram que a detecção analítica por imunoblote de anticorpos da classe IgE é significativamente mais sensível quando se utiliza a beta-lactoglobulina polimerizada no imunoensaio do que quando se utiliza o monômero de beta-lactoglobulina. Os resultados mostraram que a dosagem de IgE por imunoCAP abaixo dos limites de detecção, ou o teste cutâneo-alérgico não reagente, não descartam a possibilidade de hipersensibilidade mediada por IgE como demonstrado pelo imunoblote.

Foram realizados testes cutâneos pareados com beta-lactoglobulina nativa e polimerizada em 22 crianças sintomáticas, com diagnóstico de alergia à beta-lactoglobulina mediada por IgE, confirmado por ImmunoCAP. Um grupo controle pareado de 22 crianças assintomáticas com IgE específica para beta-lactoglobulina não detectável por ImmunoCAP foi estabelecido para comparação da técnica dos testes cutâneo-alérgicos.

Os resultados mostraram nos dois grupos que as reações cutâneas para os testes realizados com a beta-lactoglobulina polimerizada foram significativamente menores que as reações dos testes realizados com a beta-lactoglobulina nativa.

A imunorreatividade mediada por células contra a beta-lactoglobulina nativa e contra a beta-lactoglobulina polimerizada pela transglutaminase foi estudada em 49 indivíduos atópicos através de testes pareados de enfrentamento antigênico *ex vivo* monitorado pelo teste de inibição da aderência leucocitária.

Os resultados mostraram que a imunorreatividade mediada por células contra a beta-lactoglobulina nativa não é significativamente diferente da observada contra a beta-lactoglobulina polimerizada pela transglutaminase quando o enfrentamento *ex vivo* é monitorado pelo teste de inibição da aderência leucocitária.

A polimerização é um método promissor para a indução de imunotolerância às proteínas alimentares, uma vez que diminui a imunorreatividade *in vivo* e não destrói os epítomos alergênicos como demonstrado nos ensaios *in vitro* e *ex vivo*.

ABSTRACT

STUDY ABOUT THE IMMUNOREACTIVITY AGAINST NATIVE AND POLYMERIZED BOVINE BETA-LACTOGLOBULIN IN CHILDREN AND ADULTS WITH ALLERGY AND/OR INTOLERANCE TO COW'S MILK

Cow's milk allergy is a debilitating condition of difficult diagnosis and, until the moment, without a definitive solution that can be presented to the patient by the medical attendant. Amongst the dozens of proteins of the cow's milk, the beta-lactoglobulin (Bos d 5) is one of most allergenic for the fact that it is not produced by the human being and because of its hard digestibility. The allergenicity of beta-lactoglobulin in human beings is a subject well studied but little is known about the allergenicity of bioprocessed proteins as the polymerized beta-lactoglobulin.

The objective of the present work is to study the immunoreactivity of the polymerized beta-lactoglobulin and to compare it with the immunoreactivity of the native beta-lactoglobulin in patients with and without clinical diagnosis of hypersensitivity/intolerance to cow's milk. It was used thermically induced polymerization and polymerization induced by transglutaminase in presence of cystein.

Five groups of patients (two intolerant groups and three tolerant groups) proceeding from two clinics of distinct characteristics had been studied according to presentation of the symptoms and submitted to allergic cutaneous tests and immunoassays for research of specific-IgE against beta-lactoglobulin, as well evaluation of cell-mediated immunoreactivity by challenge tests monitored by Leukocyte Adherence Inhibition Test.

Side to side cutaneous tests with native and polymerized beta-lactoglobulin in 56 adults with problematic hypersensitivity to cow's milk previously diagnosed as intolerants to the lactose had been carried through, as well research of specific-IgE against beta-lactoglobulin by ImmunoCAP and immunoblot. A control group of 20 subjects tolerant to cow's milk people with absence of specific-IgE against beta-lactoglobulin (detectable by ImmunoCAP or by allergic skin tests) had been selected for control of the technique of

immunoblot. The results had shown that the analytical detection by immunoblot of specific-IgE is significantly more sensible when the polymerized beta-lactoglobulin is used in the immunoassay instead of the beta-lactoglobulin monomer.

The results had shown that the research of specific-IgE by ImmunoCAP below of the detection limits, or the absence of cutaneous reactivity does not discard the possibility of IgE-mediated hypersensitivity as demonstrated by immunoblot.

Side to side cutaneous tests with native and polymerized beta-lactoglobulin had been carried through in 22 symptomatic children, with confirmed by ImmunoCAP diagnosis of IgE-mediated allergy to beta-lactoglobulin. A matched control group of 22 asymptomatic children with not detectable specific-IgE for beta-lactoglobulin by ImmunoCAP was established for comparison of the technique of the skin tests.

The results had shown that the cutaneous reactions carried through with the polymerized beta-lactoglobulin had been significantly lesser than the reactions of the cutaneous reactions carried through with the native beta-lactoglobulin.

The cell-mediated immunoreactivity was studied on 49 atopic subjects by paired *ex vivo* allergen challenges monitored by the leukocyte adherence inhibition test. The results did not show significant difference between the immunoreactivity against native versus polymerized beta-lactoglobulin.

The polymerization of proteic antigens is a promising study model to be further investigated as a potential tool for the therapeutic induction of immune tolerance to alimentary proteins, because it decreases the *in vivo* immunoreactivity and does not destroy the allergenic epitopes as demonstrated by the *in vitro* and *ex vivo* assays.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características clínicas dos 56 pacientes do grupo A	58
Tabela 2 Testes cutâneos e ImmunoCAP dos 56 pacientes do grupo A	60
Tabela 3 Resultados dos imunoblotes dos 53 pacientes do grupo A	61
Tabela 4 Características clínicas e resultados dos testes cutâneos em 20 pacientes tolerantes ao leite de vaca, IgE específica para β -lactoglobulina indetectável ao ImmunoCAP, com testes cutâneos não reagentes às β -lactoglobulinas nativa e polimerizada com transglutaminase (grupo controle B)	73
Tabela 5 Características clínicas e resultados dos testes cutâneos em 22 crianças com diagnóstico clínico de alergia ao leite de vaca (grupo C)	75
Tabela 6 Características clínicas e resultados dos controles positivos com histamina (CP) dos testes cutâneos em 22 pacientes tolerantes ao leite de vaca com IgE específica para β -lactoglobulina indetectável ao ImmunoCAP, com testes cutâneos não reagentes às β -lactoglobulinas nativa e polimerizada com transglutaminase (grupo controle D)	78
Tabela 7 Resultados por pacientes dos testes de inibição da aderência do leucócito enfrentados com beta-lactoglobulina nativa e beta-lactoglobulina polimerizada	79
Tabela 8. Características clínicas dos pacientes do grupo A e resultados analíticos do imunoblote realizado com leite de vaca desnatado	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Classificação das reações adversas aos alimentos, segundo o *National Institute of Allergy and Infectious Diseases dos Estados Unidos*. Adaptado de Boyce, JA, et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States.: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010;126:S1-S58 **8**

Figura 2 Média dos diâmetros papulares médios obtidos por teste de puntura dos 56 participantes do grupo A **62**

Figura 3 Média dos diâmetros papulares médios obtidos por teste de puntura dos 45 participantes do grupo A com imunoblote reagente para IgE específico contra a β -Lactoglobulina **62**

Figura 4 Sensibilidade analítica do ImmunoCAP (CAP); do teste de puntura para β -Lactoglobulina (BLG); da combinação do teste de puntura para β -Lactoglobulina nativa e polimerizada por transglutaminase em presença de cisteína (BLG/POL); da combinação do ImmunoCAP e do teste de puntura para β -Lactoglobulina nativa (CAP/BLG); da combinação do ImmunoCAP, do teste de puntura para β -Lactoglobulina nativa e polimerizada por transglutaminase em presença de cisteína (CAP/BLG/POL) para detecção de IgE específica contra a β -Lactoglobulina bovina em 45 pacientes com imunoblote positivo para IgE específico contra a β -lactoglobulina padronizado como referência (BLOT) **64**

Figura 5 Gel de poliacrilamida (5%T-20%C) após corrida eletroforética, corado com Coumassie blue **64**

Figura 6 Membrana de nitrocelulose eletrotransferida de um gel de gradiente preparado com P: padrão 10 a 170 kDa; (1) β -Lg aquecida a 90°C por 10 minutos sem mercaptoetanol; (2) β -Lg aquecida a 90°C por 10 minutos com mercaptoetanol; (3) β -Lg não aquecida com mercaptoetanol; (4) β -Lg sem mercaptoetanol não aquecida e (5) BSA 1 mg/mL aquecida com mercaptoetanol. Incubada com o soro de um paciente (MCNM) **66**

Figura 7 Imunoblote realizado com soro de cinco pacientes com β -Lg preparada em condições redutoras sem aquecimento (coluna 1) e em condições redutoras padrão com aquecimento (coluna 2) **66**

Figura 8 Imunoblote realizado com soro de cinco pacientes com β -Lg preparada em condições redutoras sem aquecimento (coluna 1) e em condições redutoras padrão com aquecimento (coluna 2) **67**

Figura 9 Imunoblote com β -Lg em condições redutoras com aquecimento de amostras de soro dos 45 pacientes reativos do grupo A. P = Padrão de massas moleculares **70**

Figura 10 Média das densidades ópticas médias corrigidas obtidas na leitura densitométrica nas bandas distribuídas a 72 kDa, 36 kDa e 18 kDa nos pacientes do grupo A **71**

Figura 11 Imunoblote com β -Lg em condições redutoras com aquecimento de amostras de soro de quatro pacientes do grupo B não reativos (JB, MA, BPO, DHS); do único paciente do grupo B reativo (NM) e de um paciente do grupo A reativo, usado como controle do blot (ER) **71**

Figura 12 Média dos diâmetros papulares médios obtidos por teste de puntura dos 22 participantes do grupo C. CP: controle positivo (histamina 1mg/mL); BLG: β -Lactoglobulina nativa (BLG) e TgPol-BLG: β -Lactoglobulina polimerizada por transglutaminase em presença de cisteína **73**

Figura 13 Teste de inibição da aderência leucocitária em dois pacientes do grupo E antes e após a lavagem da câmara em PBS. O paciente A demonstrou taxa de inibição da aderência (LAI) = 100%. O paciente B demonstrou taxa de inibição da aderência 54%. A lâmina C é o controle (sem antígeno) com taxa de aderência = 100% **80**

Figura 14 Gel de poliacrilamida após eletroforese com leite de vaca desnatado, corado com coomassie blue. BSA: Albumina sérica bovina; BLG: beta-lactoglobulina; ALA: alfa-lactalbumina. Padrão de proteínas pré-coradas de 10 a 170 kDa **82**

Figura 15 Imagem de membranas de nitrocelulose (0,45 μ m) após transferência de gel de SDS-PAGE com leite desnatado e incubação com soro de três pacientes (GRC, MCSS e STMC), anticorpo primário IgG caprino anti-IgE-humano, anticorpo secundário de coelho anti-IgG caprino conjugado com peroxidase do rábano, seguido de revelação com DAB. Os imunoblotes mostram três diferentes padrões de sensibilização: sensibilização somente para caseínas (19 a 25 kDa); sensibilização somente para o dímero da beta-lactoglobulina (36kDa) e sensibilização a ambas proteínas **82**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Baseada na nomenclatura do tecido linfóide associado a mucosas²

APC = Célula Apresentadora de Antígeno (Antigen Presenting Cell)

BALT = Tecido linfóide associado ao brônquio (Bronchus-Associated Lymphoid Tissue).

BCR = Receptor de célula B (linfócito Bursa-dependente).

Bos D 5 = "*Bos domesticus* 5" (nomenclatura oficial do quinto antígeno do leite bovino, referindo-se à beta-lactoglobulina).

CD = Cluster of Differentiation (proteína de membrana celular de especificidade imunogênica marcadora de diferenciação funcional).

CCR9 = Receptor de Quimiocina 9 (Chemokine Receptor 9).

DC = Célula Dendrítica (Dendritic cell).

EC = Célula Epitelial (Epithelial cell).

ELISA = (Enzyme-linked immunosorbent assay) = Técnica bioquímica utilizada para detectar a presença de um determinante antigênico (que pode ser um anticorpo) em determinada amostra. Utiliza um anticorpo específico conjugado a uma enzima capaz de converter um substrato em sinal quantificável (como, por exemplo, um fluorocromo capaz de fluorescer quando exposto a determinado comprimento de onda de luz). A quantificação da fluorescência (ou da resultante da atividade enzimática) permite a inferência da quantidade do determinante antigênico na amostra.

ELISPOT = (Enzyme-linked immunosorbent spot assay) = Técnica de ELISA modificada que permite a mensuração do produto secretório individual (citocinas ou anticorpos) de células isoladas ativadas.

FAE = Epitélio associado ao folículo (Follicle-Associated Epithelium).

FcεRI = Receptor de alta afinidade para a porção Fc da IgE.

GALT = Tecido linfóide associado ao intestino (Gut-Associated Lymphoid Tissue).

IC = Intervalo de confiança

IEL = Linfócitos Intra-Epiteliais (Intraepithelial Lymphocytes).

IgA = Imunoglobulina de classe A.

IgAs = SIgA (secretory IgA) Imunoglobulina de classe A secretora.

IgE = Imunoglobulina de classe E.

IgG = Imunoglobulina de classe G.

IgM = Imunoglobulina de classe M.

IgMs = sIgM (secretory IgM) Imunoglobulina de classe M secretora.

IL = Interleucina (IL-2 = Interleucina 2, IL-10 = Interleucina 10, etc).

ILF = Folículo linfóide solitário (Isolated Lymphoid Follicle).

IFN = Interferon.

iTreg = inducible Treg (Linfócitos T reguladores induzíveis na periferia)

IPEX = (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked) síndrome genética caracterizada pela ausência de linfócitos Treg devido a alteração do gene FOXP3.

J - chain = Cadeia juncional (Joining chain).

LP = Indivíduos Lactase-Persistentes.

LNP = Indivíduos Lactase-Não-Persistentes.

LIMR = Receptor de Membrana Interativo de Lipocalinas (Lipocalin-Interacting-Membrane-Receptor).

MAdCAM – 1 = Adressina vascular localizada no endotélio da lâmina própria da mucosa intestinal (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1) ligante de $\alpha 4\beta 7$.

MALT = Tecido linfóide associado à mucosa (Mucosal-Associated Lymphoid Tissue).

MAMPS = Microbial-Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados a Micróbios).

MHC = Complexo Maior de Histocompatibilidade (Major Histocompatibility

Complex).

MLN = Linfonodo mesentérico (Mesenteric Lymph Node).

NALT = Tecido linfóide da nasofaringe (Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue).

NK = Natural Killer (células Natural Killer).

nTreg = natural Treg (Linfócitos T reguladores diferenciados no Timo)

LP = Lâmina própria (refere-se geralmente ao tecido conjuntivo da mucosa intestinal acima da muscular da mucosa (excluindo assim a submucosa) podendo ser aplicado a mucosas de outros órgãos.

PAMPS = Patogens-Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados a Patógenos).

PP = Placa de Peyer.

PP14 = Proteína da Gravidez 14 (Pregnant Protein 14).

pIgA = IgA polimerizada (polymeric IgA).

pIgR = Receptor de pIg (Polymeric Ig receptor or membrane SC).

RAST = Radio-Allergo-Sorbent-Test (para dosagem de IgE antígeno-específica).

SC = Componente Secretor associado à IgAs (secretory component).

SDS-PAGE = Eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida em tampão de dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

TCR = Receptor de célula T (linfócito Timo-dependente).

TGF- β = Fator de Transformação do Crescimento – β .

Th1 = Linfócito T helper 1.

Th2 = Linfócito T helper 2.

TNF = Fator de Necrose Tumoral (Tumor Necrosis Factor).

Treg = Linfócito T regulador.

LISTA DE NOTAÇÕES

β -Lg = Beta-Lactoglobulina bovina.

Pol β -Lg = Imunoglobulina polimerizada.

TgPol β -LG = Beta-Lactoglobulina bovina polimerizada pela transglutaminase em presença de cisteína.

20% GS = Glicerol diluído a 20% em solução salina a 0,9%

Imunoblote = Técnica por meio da qual se pesquisam anticorpos específicos contra proteínas (distribuídas em gel de poliacrilamida por meio de eletroforese), transferidas (por meio de segunda eletroforese) para fase sólida de nitrocelulose, que após ser incubada com o soro do paciente é re-incubada com antianticorpos conjugados para revelação.

DPM = Diâmetro papular médio observado no teste cutâneo de leitura imediata

SUMARIO

FOLHA DE APROVAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA.....	III
DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS.....	VII
EPIGRAFE.....	IX
RESUMO	XII
ABSTRACT.....	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE FIGURAS.....	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIX
LISTA DE NOTAÇÕES.....	XXIII
SUMARIO.....	XXV
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 OBJETIVOS DA PESQUISA	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
4 RESULTADOS	57
5 DISCUSSÃO.....	85
6 CONCLUSÕES.....	97
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
9 ANEXOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	135

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico do problema

O relacionamento das sociedades humanas primitivas com as diversas espécies de animais domesticáveis foi um dos principais fatores determinantes das mudanças evolutivas que conduziram grupamentos humanos semi-selvagens a se transformarem nas sociedades tecnológicas da atualidade. O primeiro relacionamento efetivo do homem moderno (*Homo sapiens*) com animal domesticável aconteceu no período paleolítico com o cachorro (*Canis domesticus*).³ A domesticação do cão foi uma das principais estratégias utilizadas pelo homem para suplantiar diversas outras espécies animais fisicamente mais fortes, mais agressivas e com capacidade olfatória mais desenvolvida. As habilidades cognitivo-sociais, o faro, a audição e a fidelidade do cão exerceram uma função insubstituível neste período nômade da humanidade, onde a caça e a coleta eram essenciais para a sobrevivência.⁴ Durante o final do período Paleolítico, o homem primitivo começou a desenvolver relacionamentos exploratórios com animais que viviam em manadas, inicialmente através do acompanhamento à distância dos grupos, o qual evoluiu para um controle parcial dos deslocamentos migratórios, para finalmente estabelecer, no período Neolítico, comportamentos simbióticos, por meio da domesticação e restrição destes animais ao seu local de residência.⁵ Neste mister, o auxílio do cão na atividade de pastoreio também foi fundamental. A domesticação e a exploração sistemática do gado, assim como o domínio das técnicas agrícolas, foram fatores determinantes da transição do período Paleolítico (onde a humanidade era caracteristicamente nômade) para o Neolítico, onde o homem tornou-se essencialmente sedentário. Esta transição foi acompanhada pelo aparecimento do fenótipo lactase-persistente na espécie humana, que não foi encontrado no DNA de fósseis dos homens da primeira fase do período neolítico.⁶ Aparentemente a persistência da lactase na idade adulta foi uma mutação que surgiu após a domesticação de animais leiteiros e que conferiram aos seus portadores uma vantagem adaptativa, e conseqüente proliferação pela Europa. Ao utilizar o termo “domesticação”, geralmente queremos significar o processo no qual, animais selvagens geram (sob supervisão do criador) proles mais apropriadas para o convívio com

humanos. Certas transformações físicas e comportamentais foram identificadas como critérios de domesticação (redução no tamanho e na robustez do esqueleto, diminuição da arquitetura crânio-facial e do tamanho dos dentes). Estas alterações também ocorreram paralelamente com as populações humanas, em função da construção de abrigos, alteração da alimentação e da mobilidade. Pode-se dizer que a domesticação do gado ocorre de forma paralela à fixação do ser humano ao seu local doméstico, ou seja, a “domesticação” do ser humano.⁷ Com a domesticação, a secreção láctea dos rebanhos pôde ser utilizada como fonte alimentar pelos primeiros “fazendeiros”, que na tentativa de preservar o alimento (na ausência de refrigeração artificial), desenvolveram técnicas artesanais de transformação do leite em subprodutos mais duráveis, como a coalhada e o queijo. A análise isotópica de fósseis bovinos aponta o início da utilização do leite animal na produção do queijo exatamente para o período Neolítico.⁸ Durante milênios, esta relação simbiótica entre a humanidade e os rebanhos de mamíferos estreitou-se a ponto de não conseguirmos conceber a existência da humanidade sem a presença destes animais como fontes de proteínas e outros nutrientes, não apenas na mesa dos adultos, mas como substituto do aleitamento materno dos bebês. Aventa-se, inclusive, a possibilidade de que opióides naturais derivados da degradação da caseína bovina (β -casomorfina) possam exercer possível efeito aditivo sobre o cérebro em formação de mamíferos em desenvolvimento, criando uma verdadeira “dependência” química para o ser humano.⁹ Assim, não causa estranheza, o fato do hábito de alimentar bebês através do fornecimento de leite de vaca, estar tão fortemente arraigado à cultura de nossa sociedade (apesar dos malefícios que a suspensão do aleitamento materno conhecidamente traz para o ser humano nos seus primeiros meses de vida). Esta mentalidade está começando a mudar, mas já houve tempo em que os médicos “especialistas” em pediatria, dedicavam uma boa parte de seu tempo “educando” as mães de seus clientes a preparar “adequadamente” para seus bebês, mamadeiras de leite de vaca, inadvertidos de muitos dos malefícios desta atitude.¹⁰ Hoje sabemos que a humanidade paga um preço por este alimento, e uma série de doenças podem ter sua origem no consumo inadvertido da secreção mamária bovina. O leite de vaca, administrado *in natura*, e sem o processo de esterilização adequado pode ser responsável pela transmissão de uma série de zoonoses, como a

salmonelose, a brucelose, a listeriose, a toxoplasmose, a campilobacteriose, a tuberculose e a yersiniose (entre outras).¹¹ Ferver o leite foi por muito tempo a única maneira de contornar este risco até que a indústria alimentícia começou a adotar a pasteurização como método prático para esterilizar volumes cada vez maiores de leite de vaca. Neste período, a pasteurização parecia ser a solução ideal para a questão da alimentação do bebê, tornando o leite de vaca aparentemente adequado. Trabalhos realizados em animais, no entanto, sugerem que a pasteurização, na medida em que aumenta a formação de agregados protéicos, aumenta a captação das proteínas bovinas pelas placas de Peyer, promovendo a sensibilização imunológica.¹² De maneira adicional, descobriu-se que a pasteurização do leite diminui significativamente a concentração de citocinas associadas à indução da tolerância imunológica.¹³ Posteriormente, como forma de transformar o prosaico leite de vaca em um produto de maior durabilidade comercial, o mesmo foi liofilizado e embalado em latas de metal, preservado com conservantes antimicrobianos e um investimento maciço de marketing foi empregado para associar ao produto uma falsa sensação de segurança, praticidade e até mesmo de superioridade em relação ao aleitamento natural. Alguns produtos lácteos foram até alardeados como “terapêuticos” para o controle da alergia.¹⁴ Paralelamente, percebia-se também que a composição do leite de vaca diferia grosseiramente do leite materno. O leite de vaca natural possui quantidade excessiva de proteínas e sais minerais, sendo hiperosmolar¹⁵ e deficiente em uma série de fatores de crescimento fisiológicos para o bebê humano.¹⁶ O “marketing” da indústria alimentícia desenvolveu então o conceito do leite “maternizado” ou seja, modificado para assemelhar-se nutricionalmente ao leite materno (termo atualmente proscrito pelo *International Code of Marketing of Breastmilk Substitutes* da *World Health Organization*).¹⁷ Criou-se assim um produto com aparente perfil de segurança que não revelava ao consumidor problemas imunológicos capitais como: I) a carência no leite de vaca “maternizado” de fatores protetores, como as imunoglobulinas, as citocinas tolerogênicas¹⁸ e as enzimas bactericidas e bacteriostáticas (como a lisozima e a lactoferrina);¹⁹ II) a alergenicidade²⁰ inerente à ingestão e absorção sistêmica de proteínas “xenogênicas” não digeridas e absorvidas intactas pelo sistema digestório imaturo do lactente²¹ e III) a presença no leite de vaca de uma proteína potencialmente

imunossupressora, inexistente no leite humano, e forte candidata a ser responsabilizada pelo desequilíbrio imunológico que pode comprometer o desenvolvimento natural da imunotolerância do lactente: a beta-lactoglobulina bovina (Bos d 5), da qual falaremos com detalhes adiante. O primeiro estudo sistematicamente conduzido sobre a alergia ao leite de vaca foi realizado por Besredka no Instituto Pasteur e publicado em 1909.²² Em seu tratado sobre a “anafilaxia láctica”, Besredka descreve toda a metodologia para sensibilizar cobaias através de injeções subcutâneas de leite de vaca fervido, de como provocar a anafilaxia através da injeção intra-cerebral de leite de vaca e como promover a dessensibilização (“*vaccination antianaphylactique*”) pela administração por via oral do leite de vaca a cobaias sensibilizadas (o que chamamos hoje de indução de tolerância oral).²³

1.2 Reações adversas a alimentos

O uso de nomenclatura padronizada²⁴ que não deixe margem para dúvidas ou interpretações ambíguas é essencial, não somente para que pesquisadores e clínicos possam extrair conclusões adequadas de seus experimentos,²⁵ mas também para que as estratégias terapêuticas e profiláticas possam ser convenientemente propostas aos pacientes.²⁶

O termo “alergia alimentar” é muitas vezes utilizado pelo leigo, de maneira inapropriada, para representar qualquer tipo de condição supostamente desencadeada pela ingestão de algum alimento específico.²⁷ O diagnóstico médico de “alergia”, no entanto, deve necessariamente implicar no conhecimento do mecanismo imune responsável pela hipersensibilidade.²⁸ Quando o mecanismo desencadeante dos sintomas não está esclarecido, o melhor termo a ser utilizado é “reação adversa ao alimento”.²⁹ Se os sintomas são isolados (não reprodutíveis), diz-se que é uma reação adversa ocasional. Quando a sintomatologia é reprodutível, causada por estímulos específicos e provocados por doses normalmente toleradas pela maioria das pessoas, classifica-se a reação adversa como “hipersensibilidade alimentar”,³⁰ uma denominação genérica que não implica na fisiopatologia do mecanismo relacionado. Se a natureza da reação é uma hipersensibilidade confirmadamente causada por mecanismos imunes, emprega-se o termo “alergia alimentar”. Se os mecanismos responsáveis pela reação

de hipersensibilidade forem definidos como de natureza não imune, deve-se empregar o termo “intolerância alimentar” ou “hipersensibilidade alimentar não alérgica”. Nas alergias alimentares, por sua vez, procura-se fazer a distinção entre as reações mediada por IgE, as reações não mediada por IgE e as reações de natureza mista, onde estão envolvidos mecanismos mediados por IgE e mecanismos não mediados por IgE.³¹ Vide figura 1 na página 8.

1.2.1 Reações adversas a alimentos de natureza não imune

As reações adversas aos alimentos de natureza não imunológica decorrem de propriedades inerentes ao alimento ou a características fisiológicas do indivíduo.³² Podem ser de natureza tóxica (por exemplo, por contaminação com microorganismos patogênicos e seus produtos),³³ ou pela presença de componentes farmacologicamente ativos na alimentação (como no complexo sintomático do glutamato monossódico).³⁴ Algumas destas reações são difíceis de serem distinguidas de uma verdadeira reação alérgica, como no caso da intoxicação pela toxina escombróide³⁵ (que na verdade é a própria histamina produzida pela degradação enzimática bacteriana do aminoácido histidina), suscetível de ocorrer com alimentos mal refrigerados como peixes escombróides (atum, sardinha, cavala, etc.) ou queijos suíços. Outras intolerâncias são devidas à deficiência enzimática específica do indivíduo afetado, como por exemplo, a enxaqueca induzida por ingestão de alimentos ricos em tiramina em indivíduos com defeito metabólico para o processamento deste aminoácido,³⁶ ou a deficiência de lactase (da qual falaremos com mais detalhes adiante no capítulo específico sobre reações adversas a laticínios).

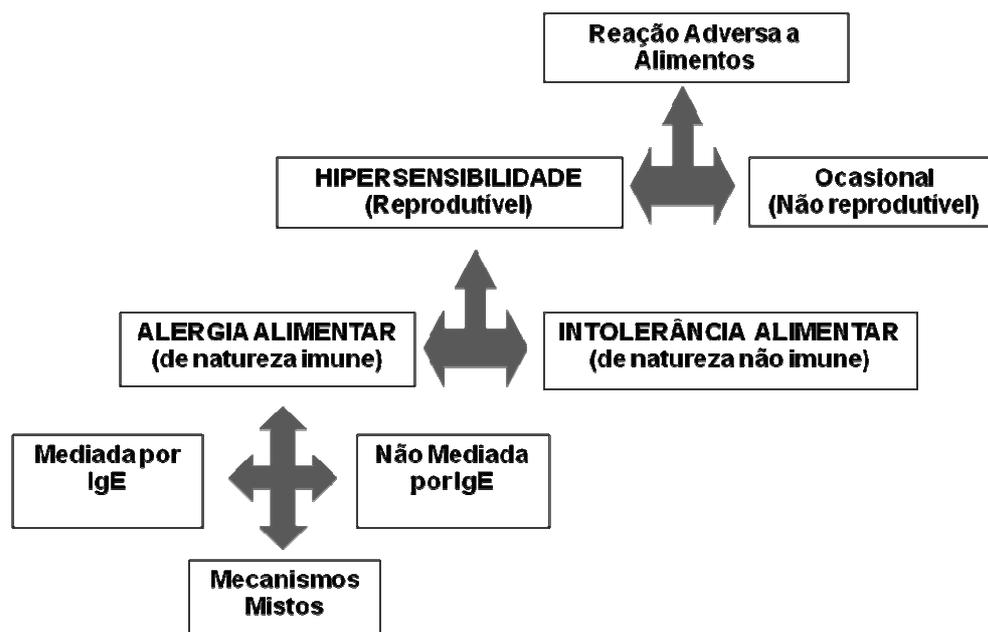


Figura 1 Classificação das reações adversas aos alimentos, segundo o National Institute of Allergy and Infectious Diseases dos Estados Unidos. Adaptado de Boyce, JA, et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States.: Journal of Allergy and Clinical Immunology 2010;126:S1-S58.

1.2.2 Reações adversas a alimentos de natureza imune

A linha de raciocínio clínico que classifica as reações alérgicas a alimentos em “mediadas por IgE” e “não-mediadas por IgE” segue uma abordagem simplificada, moldada pelas limitações diagnósticas impostas pela prática clínica.³⁷ Apesar de ser a classificação útil no manejo dos pacientes no ambulatório, está longe de refletir a fisiopatologia do problema.³⁸ Diversas classificações já foram propostas para a alergia alimentar.

1.3 Epidemiologia das alergias alimentares

A incidência exata das alergias alimentares ainda é desconhecida. Meta-análise publicada em 2007 mostrou heterogeneidade acentuada das taxas de prevalência, como resultado das diferentes metodologias empregadas e das diferenças entre as populações estudadas. De um total de 934 artigos encontrados, apenas 51 foram considerados adequados para inclusão. A incidência de “alergia alimentar” auto-relatada variava de 3% a 35%.³⁹ O problema na avaliação real desta incidência é que boa parcela dos sintomas reconhecidos pela população como “alergia alimentar”, não preenchem necessariamente os critérios médicos para o diagnóstico de uma doença de natureza imunológica. Além disso, os testes diagnósticos disponíveis ainda são imprecisos e deixam margem não negligenciável para falsos positivos e falsos negativos. Mesmo os testes com dieta de exclusão e provocação nem sempre são confiáveis, uma vez que muitos pacientes alérgicos não apresentam necessariamente reações a todo contato com determinado antígeno alimentar. Algumas vezes o paciente tolera a ingestão de determinado alimento e em outras apresenta inequivocamente os sintomas.⁴⁰ Vários fatores podem influenciar estas diferenças, como a falha na digestão protéica,⁴¹ o tipo de preparo culinário ou industrial ao qual o alimento é submetido,⁴² e até a realização de práticas esportivas após a refeição.⁴³ Estimativas clássicas americanas situam a prevalência da alergia alimentar em torno de 3,7% da população adulta e 6% da população infantil.⁴⁴

1.4 Diagnóstico clínico das alergias alimentares

O diagnóstico clínico de hipersensibilidade de natureza imune baseia-se nos sintomas descritos na anamnese, nos sinais encontrados durante o exame propedêutico, nos resultados dos testes cutâneo-alérgicos, nas provas de provocação realizadas *in vivo* e nos resultados dos exames laboratoriais realizados *in vitro*.⁴⁵ O ato de diagnosticar uma doença imuno-alérgica exige sua diferenciação de uma série de outras entidades nosológicas com perfis semelhantes de sinais e sintomas, o que torna esta tarefa desafio complexo devido à inexistência de um padrão ouro para o diagnóstico clínico inequívoco.⁴⁶ Alguns autores adotam a prova de provocação com o alérgeno alimentar sob a metodologia duplo-cego placebo-controlado como teste diagnóstico padrão, inclusive elegendo-o como "padrão-ouro".^{47, 48} No entanto, os testes de provocação não distinguem entre a hipersensibilidade de natureza imune das intolerâncias não imunes, estão sujeitos a alguns vieses (como a realização ou não de esforço físico como desencadeador da crise ou a ingestão concomitante de coadjuvantes),^{49,50} são de elaboração complexa e necessitam ser realizados em ambientes monitorados. Requerem assistência de pessoal especializado em ambiente hospitalar por período prolongado de observação pois não é isenta de riscos.⁵¹ Em função destas dificuldades, alguns autores propõem padrões de corte baseados na dosagem de IgE específica, nas quais haveria maior chance de positividade na prova de provocação, na tentativa de confirmar o diagnóstico sem a necessidade da provocação com os alimentos suspeitos.^{52, 53}

Os testes *in vitro*, por outro lado são absolutamente seguros, mas geralmente limitados ao componente sérico-humoral do paciente, o qual nem sempre representa o compartimento orgânico onde se processa a fisiopatologia da doença alérgica, que muitas vezes tem um caráter anatômico ou tecidual delimitado. Mesmo pacientes que apresentam hipersensibilidade mediada por mediadores típicos de mastócitos e eosinófilos, como a proteína catiônica eosinofílica e a histamina, (demonstrados por dosagem luminal após prova de provocação intestinal), podem ter níveis normais de anticorpos específicos no soro, sugerindo a produção exclusivamente local destes mediadores.^{54, 55} Testes cutâneos também podem estar sujeitos a apresentar reações locais pela presença no alimento de liberadores inespecíficos de histamina. No caso do

leite de vaca, especificamente, isto pode ocorrer pela presença da beta-casomorfina-7, um opióide capaz de liberar histamina diretamente dos mastócitos não sensibilizados imunologicamente.⁵⁶

A identificação do(s) alimento(s) agressor(es) muitas vezes é um desafio para o clínico, que possui poucas ferramentas diagnósticas ao seu alcance. A dosagem de IgE específica e os testes cutâneo-alérgicos imediatos têm limitado alcance para identificar as reações do tipo I de Gell e Coombs.⁵⁷ Reações tardias do tipo IV teoricamente poderiam ser identificadas pelo teste de contato atópico que ainda está longe de ser padronizada para uso clínico de rotina.

Na tentativa de superar esta dificuldade alguns autores propuseram o enfrentamento “*ex vivo*” com o antígeno suspeito no duplo intuito de identificar o alimento causador e o mecanismo imunológico envolvido. O enfrentamento “*ex vivo*” com a beta-Lactoglobulina bovina (Bos d 5), monitorado através do teste de inibição da migração do leucócito foi descrito com entusiasmo em uma renomada revista de pediatria como uma promessa para substituir os testes de provocação oral, mas a sua relativa complexidade e subjetividade analítica não o popularizou como um exame de rotina, tendo sido até o momento muito pouco explorado.^{58, 59}

Testes de proliferação de linfócitos⁶⁰ e de enfrentamento de basófilos⁶¹ são utilizados na pesquisa científica, mas muito complexos e dispendiosos para serem utilizados na prática clínica.

Deste modo, cada informação conseguida compõe apenas uma peça entre várias outras necessárias para a compilação do diagnóstico clínico definitivo. Nenhuma informação isolada possui valor absoluto para a inclusão ou exclusão do diagnóstico de alergia alimentar, mas alterações acima de certos limiares estão fortemente correlacionadas com sintomas clínicos. Por essa razão mesmo em trabalhos científicos padronizados, se aceita por razoável a inclusão de pacientes no estudo quando estes apresentam uma “história clínica convincente” de alergia, em função mesmo da dificuldade de se padronizar um único teste diagnóstico como critério de inclusão ou de exclusão.⁶²

1.4.1 Classificações das alergias alimentares

As alergias alimentares, de maneira geral, podem ser classificadas segundo a natureza da reação de hipersensibilidade, segundo a natureza do alérgeno, ou segundo o contexto imune em que se apresenta.

1.4.1.2 Classificação segundo a natureza da hipersensibilidade

As descobertas científicas na área da imunologia das reações de hipersensibilidade a proteínas alimentares acompanharam a própria caracterização destas proteínas. Em uma época em que a estrutura primária das proteínas era desconhecida, o estudo da anafilaxia com cobaias sensibilizadas e seus respectivos anticorpos (reaginas e precipitinas) eram elementos mais considerados para a compreensão da natureza bioquímica das proteínas em si, do que o estudo propriamente dito do fenômeno alérgico. A especificidade da interação antígeno-anticorpo e as conseqüências biológicas destas interações geraram um ramo de estudo chamado de "química da anafilaxia", que no começo do século XX já geravam as primeiras revisões, uma das mais citadas é a publicada por Gideon Wells em 1911 enfocando proteínas isoladas do ovo de galinha e do leite de vaca.⁶³

Deste a publicação clássica de Gell e Coombs, pouco se acrescentou em relação à classificação das reações de hipersensibilidade.⁵⁷ As reações do tipo I de Gell e Coombs são as mediadas por IgE que degranulam diretamente as células efectoras (mastócitos e basófilos) com liberação de autacóides pré e pós-formados. As reações do tipo II são caracterizadas por interações antígeno-anticorpo que ativam complemento e estimulam a produção local de anafilatoxinas (C3a e C5a) que recrutam leucócitos polimorfonucleares. Estes liberam enzimas hidrolíticas que promovem as lesões subseqüentes (citotoxicidade). As reações do tipo III são desencadeadas por imunocomplexos circulantes, mas também dependem de células citotóxicas efectoras, assim como do sistema de complemento. As reações do tipo IV são mediadas por células e independem de anticorpos séricos específicos. Já se propôs incluir nesta classificação as reações de hipersensibilidade do tipo V que envolveriam as reações granulomatosas.⁶⁴ Ao tratarmos de reações de natureza imunológica devemos distinguir quais dos quatro (ou cinco) tipos de reações de

hipersensibilidade podem estar envolvidas. Na prática clínica nem sempre isso é possível e na maioria das vezes simplesmente dividimos as reações de natureza imunológica em “mediadas por IgE” (ou do tipo I de Gell e Coombs) e as “não mediadas por IgE” (ou dos tipos II, III e IV de Gell e Coombs).⁶⁵ Contudo, algumas síndromes são compreendidas como de natureza mista, onde mecanismos mediados por IgE e mecanismos não mediados por IgE participam conjuntamente da fisiopatologia do processo.⁶⁶

1.4.1.2 Classificação segundo a natureza do alérgeno

De acordo com a apresentação clínica, a alergia alimentar pode ser dividida em dois grupos ou classes. Na assim chamada alergia alimentar de classe 1, o processo de sensibilização ocorre no trato gastrintestinal. A característica dos alérgenos que eliciam esta classe de alergia é o fato de serem resistentes à digestão gástrica.⁶⁷ É um tipo de alergia rara em adultos, afetando crianças pequenas como uma das primeiras manifestações da síndrome atópica. Os alérgenos mais prevalentes nesta classe são o leite de vaca, o ovo de galinha e alguns legumes. Geralmente estas manifestações desaparecem durante o decorrer da infância, sendo substituídas por outras manifestações (marcha alérgica).⁶⁸ A alergia alimentar de classe 2 é vista predominantemente em adultos e desenvolve-se em consequência de sensibilização inalatória. A base imunológica para este tipo de alergia é a reatividade cruzada (que pode ser clinicamente manifesta ou irrelevante). Os sintomas variam desde a síndrome da alergia oral (síndrome pólen-fruta) ao choque anafilático.⁶⁹ A maioria das proteínas que desencadeiam este tipo de alergia são altamente lábeis e de difícil extração e caracterização, o que torna os procedimentos diagnósticos mais complexos.⁷⁰ Ao lado destas manifestações clínicas clássicas, já bem associadas às diferentes formas de hipersensibilidade, existe uma série de outras, citadas na literatura, nas quais uma possível associação a alguma forma de hipersensibilidade alimentar não está bem estabelecida, sendo motivo de disputas e controvérsias, uma vez que carecem de suficientes elementos para implicá-las de maneira definitiva na gênese destes quadros.⁷¹ A estas controvérsias aliam-se o fato de que o diagnóstico definitivo da alergia alimentar, nem sempre é fácil de ser realizado. Apesar de extremamente úteis,

os exames laboratoriais e os testes cutâneos nem sempre são capazes de identificar as diversas formas e mecanismos responsáveis pelas hipersensibilidades de determinados pacientes, e a perspicácia e experiência do médico atendente são essenciais para o estabelecimento de uma forte suspeita ou conclusão diagnóstica.⁷²

1.4.1.3 Classificação segundo o contexto imune

A alergia alimentar pode estar associada a outros quadros de hipersensibilidade apresentados pelo paciente. De acordo com o contexto imune apresentado pelo indivíduo, propôs-se uma classificação considerando o fenótipo alérgico em três classes, que não sendo excludentes, podem ser superponíveis.⁷³

1.4.1.3.1 Atopia

As doenças atópicas incluem a dermatite atópica, a rinite alérgica e a asma e desenvolvem-se inseridas em um contexto genético complexo. O conceito de atopia, descrito inicialmente por Coca em 1923⁷⁴ refere-se à predisposição pessoal ou familiar de produzir anticorpos da classe IgE específicos em resposta aos alérgenos.⁷⁵ Apesar destes distúrbios atingirem diferentes órgãos, na maioria dos indivíduos afetados, caracterizam-se pelo aumento sérico do IgE total. A forma atópica da doença alérgica freqüentemente inicia-se com a marcha alérgica na infância quando a inflamação atinge um simples órgão como a pele o pulmão ou o nariz, ou uma combinação de todos. As manifestações cutâneas da alergia representam o começo da marcha atópica. Aproximadamente a metade dos indivíduos afetados com a dermatite atópica desenvolve asma e dois terços desenvolvem rinite alérgica. O início da marcha atópica é caracterizado pela sensibilização mediada por IgE aos alérgenos alimentares, que subseqüentemente evolui para as alergias inalatórias.⁷³

1.4.1.3.2 Monoalergia

O segundo tipo de doença alérgica, segundo o contexto imune, é a monoalergia, o assim chamado “avanço” alérgico (allergic breakthrough), caracterizado pelo desenvolvimento de hipersensibilidade IgE específica na ausência de IgE total aumentado, em indivíduos não atópicos. A monoalergia pode desenvolver-se em

qualquer época da vida sem nenhum fator predisponente. Manifesta-se de maneira “anafilactóide” com venenos de insetos, alguns alimentos ou medicamentos, ou com envolvimento de algum órgão particular como na rinite, asma ou dermatite. Geralmente mostram uma resposta muito boa à imunoterapia alérgeno-específica.⁷³

1.4.1.3.3 Alergia não mediada por IgE

Alguns indivíduos com dermatite atópica, asma e/ou rinite têm níveis normais da IgE total e específica e testes cutâneo-alérgicos não reativos. Este terceiro tipo de alergia já foi chamado de “forma não atópica”, “forma não alérgica”, “forma não associada ao IgE”, ou forma intrínseca de asma, dermatite e/ou rinite.⁷³

1.4.1.4 Classificação segundo a manifestação clínica

Sendo a alergia uma doença sistêmica, pode manifestar-se teoricamente em qualquer sistema orgânico. Ao classifica as alergias a alimentos, é útil diferenciar as manifestações clínicas de ordem gastrointestinal das de ordem extra-gastrointestinal. Esta separação nos remete às características locais e/ou sistêmicas do processo fisiopatológico.⁶⁶

1.4.1.4.1 Manifestações digestórias da alergia alimentar

De uma maneira geral é difícil classificar todos os tipos presumidos de reações de hipersensibilidade imune a alimentos sob um único conceito unificador. Dentro de um ponto de vista mecanístico, a maioria das reações são mais presumidas como de ordem imune do que provadas como tais. O melhor ponto de corte é o envolvimento de anticorpos da classe IgE e a ativação de mastócitos. O achado de eosinófilos na mucosa é sugestivo de um processo reacional, mas não se constitui em si um diagnóstico de hipersensibilidade imune. Independente do mecanismo envolvido, os sintomas da hipersensibilidade gastrointestinal são muito parecidos e diferem de acordo com o tipo de início, severidade e persistência.⁷⁶

1.4.1.4.1.1 Hipersensibilidade gastrointestinal imediata

A hipersensibilidade gastrointestinal imediata é definida como uma reação gastrointestinal mediada por IgE freqüentemente acompanhada por manifestações em outros órgãos como a pele e o pulmão. O sintoma mais proeminente após a ingestão do alimento agressor é a hipotonia gástrica, piloroespasmo e subsequente alteração do peristaltismo intestinal, levando a vômitos e diarreia. Após o contato com o antígeno a mucosa fica hiperemiada e edematosa. Biópsias realizadas antes e após o enfrentamento revelaram diminuição dos mastócitos coráveis e da histamina tecidual após o enfrentamento.⁷⁶

1.4.1.4.1.2 Síndrome da alergia oral

A síndrome da alergia oral geralmente afeta indivíduos que têm alergia ao pólen. É uma forma de alergia mediada por IgE geralmente confinada à cavidade oral caracterizada por início rápido de prurido, parestesias e edema dos lábios, língua, palato e garganta. Apresenta reatividade cruzada com frutas e com as proteínas do látex.⁷⁷ Geralmente é desencadeada por epítopos conformacionais sujeitos à desnaturação pelo cozimento e/ou pela digestão péptica.

1.4.1.4.1.3 Esofagite eosinofílica

Hipersensibilidade de natureza mista (mediada por IgE e não mediada por IgE), mais freqüente durante a infância e adolescência, envolve esofagite crônica com ou sem refluxo gastro-esofágico. Manifesta-se por disfagia, êmese, recusa alimentar, dor abdominal, irritabilidade, distúrbio do sono, constrições esofágicas e refratariedade ao tratamento anti-ácido. Os pacientes são freqüentemente reativos a vários alimentos. A biópsia revela infiltração da mucosa e submucosa com eosinófilos.⁷⁸

1.4.1.4.1.4 Gastrite eosinofílica alérgica

Hipersensibilidade de natureza mista (mediada por IgE e não mediada por IgE), ocorre mais freqüentemente na faixa etária entre a infância e a adolescência. Manifesta-se por vômitos pós-prandiais, dor abdominal, anorexia, saciedade precoce, hematêmese, ganho ponderal deficiente e piloroespasmo. A biópsia gástrica revela

infiltrado eosinofílico da mucosa e submucosa, em especial do antro gástrico.⁷⁹

1.4.1.4.1.5 Gastroenterocolite eosinofílica alérgica

A gastroenterocolite alérgica ocorre em qualquer idade e manifesta-se por sintomas semelhantes à esofagite e à gastrite alérgica. Perda de peso e atraso estatural são proeminentes. A enteropatia pode desencadear perda de proteínas e ocasionar hipogamaglobulinemia e hipoalbuminemia. Biópsia do esôfago e duodeno revelam infiltrado eosinofílico da mucosa e submucosa e a biópsia do cólon pode revelar abscessos crípticos.⁸⁰

1.4.1.4.1.6 Enterocolite por proteína da dieta

Condição não mediada por IgE, mais freqüentemente observada nos primeiros meses de vida, manifestando-se por irritabilidade, vômitos protraídos e diarreia que pode levar à desidratação. O vômito ocorre de 1 a 3 horas após a alimentação e a diarreia 5 a 8 horas após. Em crianças é provocado geralmente por leite de vaca, soja, ovo, trigo, arroz, amendoim, frango e peixe. Em adultos, quadros semelhantes podem ser causados mais comumente por frutos do mar. O exame à fresco de fezes revela sangue oculto, neutrófilos, eosinófilos e cristais de Charcot-Leyden. Sugere-se ser mediado pela secreção antígeno-induzida de citocinas inflamatórias por linfócitos T.⁸¹

1.4.1.4.1.7 Proctite por proteína da dieta

Condição não mediada por IgE, também mais comum nos primeiros meses de vida, com diarreia, esteatorreia, ganho ponderal inadequado, vômitos, distensão abdominal e malabsorção. A causa mais freqüente é hipersensibilidade não mediada por IgE ao leite de vaca, mas pode ocorrer com soja, ovo, trigo, arroz, frango e peixes em crianças maiores. A biópsia revela atrofia vilosa com aumento do comprimento das criptas, dos linfócitos intra-epiteliais.⁸²

1.5 Reações adversas aos componentes do leite de vaca

A composição do leite de vaca pode variar em função da raça bovina que o produziu e da maneira como é processado.⁸³ O leite bovino contém 3 a 3,5% de proteínas que podem ser divididas em duas subclasses: caseínas (80%) e proteínas do soro (20%) que formam um grupo de mais de trinta proteínas. Este último grupo permanece solúvel no soro após precipitação das caseínas em pH 4,6 as quais formam o coágulo. As caseínas (α S1, α S2, β A1, β A2, κ) e as proteínas do soro mostram propriedades físico-químicas e imunogênicas bem distintas.^{84, 85} A principal proteína do soro do leite bovino é a beta-lactoglobulina, que inexistente no leite humano. Sua concentração fica em torno de 3 a 4 g/L. Outras proteínas do soro bovino presentes em menor quantidade são as imunoglobulinas, a lactoferrina, a lisozima, a lactoperoxidase, as proteases, as nucleases, etc. A lactose é o único carboidrato do leite de mamíferos e não está presente em nenhum outro alimento. Sua quantidade é mais alta no leite humano (6,2 a 7,5 g/100g) seguida pelo leite bovino e caprino (3,7 a 5,1 g/100g).⁸⁶ A maior parte das gorduras encontrada no leite de vaca está na forma de triglicérides e ácidos graxos, em uma quantidade em torno de 4,10 a 4,50 g/L. Existe cerca de 0,12 g de cálcio por 100g de leite. O pH está em torno de 6,7.⁸⁷

As reações adversas a laticínios são motivo de preocupação médica desde o tempo de Hipócrates, que descreveu indivíduos que apresentavam reações adversas à ingestão de queijo. Hipócrates atribuiu intuitivamente estas reações à presença em maior ou menor quantidade de algum tipo de “constituente” ou “humor” hostil ao queijo e que agia sobre o organismo sob influência deste alimento.⁸⁸ Apesar dos avanços científicos, muitas vezes ainda nos sentimos como Hipócrates frente ao paciente com queixas específicas (ou inespecíficas) que envolvam a suspeita de reação adversa a algum tipo de laticínio. A tentativa de explicar a natureza (fisiopatologia) destas reações adversas tem seus principais empecilhos: (A) na diversidade de possibilidades, (B) no conhecimento incompleto dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos e (C) na carência de exames e testes específicos para o diagnóstico. A caracterização das reações adversas relacionadas ao consumo de laticínios pode ser em algumas ocasiões um desafio para os médicos que lidam na atenção primária, ou mesmo para os especialistas em pediatria, gastroenterologia ou alergia e imunologia. A diversidade

de mecanismos envolvidos e sobreposição de sintomas e sinais podem tornar a confecção de diagnóstico preciso em um trabalho elaborado, principalmente quando mais de um mecanismo ou mais de um alimento estão envolvidos. Apesar desta complexidade, o processo propedêutico tende a definir um único diagnóstico ou um único mecanismo fisiopatogênico na tentativa de “rotular” o paciente e minimizar a angústia do desconhecido. Geralmente o diagnóstico justificado é suficiente para dissipar a insegurança do paciente (mesmo quando os sintomas persistem), assim como para adiar uma investigação posterior onerosa e trabalhosa.⁸⁹ Esta abordagem simplificada, algumas vezes é bastante útil, principalmente ao considerarmos pacientes que tenham dificuldade para lidar com um muitas informações ou compreender as sutilezas do diagnóstico diferencial. Adicionando-se a isso os custos dos exames, é até compreensível que o médico assistente fique satisfeito com o diagnóstico simplificado, principalmente se o paciente está assegurado de que não se trata de uma doença perigosa. Uma vez eleito o “alimento culpado”, o próximo passo seria definir ou inferir o mecanismo responsável pelos sintomas clínicos. Uma perspectiva dualista coloca em evidência as hipersensibilidades imunes (alergia às proteínas) e as intolerâncias por deficiência enzimática (intolerância à lactose).⁹⁰ Várias revisões definem as diretrizes para diferenciar as alergias das intolerâncias aos laticínios,^{31, 43, 91} mas, apesar de toda elucubração teórica, existem pacientes que simplesmente não se enquadram neste tipo de polarização. Nas últimas décadas os recursos diagnósticos para diferenciar as alergias das intolerâncias têm aumentado e se disseminado, assim como seus custos. Entre as síndromes de intolerância, a mais comum é a intolerância à lactose devido à hipolactasia. O “padrão ouro” para diagnosticar a deficiência de lactase é a medida da atividade da lactase realizada diretamente no enterócito,⁹² mas este é um teste invasivo substituível satisfatoriamente por testes funcionais menos invasivos como o teste do hidrogênio expirado,^{93, 94} o teste de tolerância à lactose,⁹⁵ e o teste genético.⁹⁶ Para diagnosticar as hipersensibilidades imunes, existem os testes cutâneos, as dosagens de IgE específica em fase líquida (radiométricas, enzimáticas e colorimétricas), as dosagens de IgE específica em fase sólida (imunoblote), as técnicas de diagnóstico molecular (com identificação de imunorreatividade contra epítopos específicos)⁹⁷ e os testes de enfrentamento celular *ex vivo*.⁵⁸ Entretanto, estes recursos

nem sempre estão prontamente disponíveis para o médico assistente que às vezes depende exclusivamente de seu julgamento clínico para elaborar um diagnóstico. Este julgamento clínico nem sempre é fácil, uma vez que mesmo indivíduos com hipolactasia podem tolerar a ingestão de certa quantidade de leite devido ao tipo de microbiota colônica que albergue e de uma sensibilidade intestinal diminuída.⁹⁸ A ação da beta-galactosidase liberada do iogurte pela digestão gástrica ou biliar pode contribuir para a digestão da lactose e tolerância.⁹⁹ Em adição a esta complexidade de fatores, existem também as ingestões inadvertidas de alimentos industrializados que levam leite de vaca na composição,¹⁰⁰ e as modificações industriais das proteínas bovinas realizadas pela indústria alimentar, como por exemplo a polimerização induzida pela transglutaminase na preparação de iogurtes ou queijos cremosos.¹⁰¹ Estes fatores podem interferir no estabelecimento de um elo clínico entre a ingestão da proteína do leite e o início dos sintomas. Apesar destas dificuldades, ao diagnosticar a presença de hipersensibilidade ao leite de vaca em um paciente adulto, o médico assistente pode preferir não optar pela investigação laboratorial e basear-se nas estatísticas que relatam uma alta incidência de hipolactasia (estimada em 50 a 70% na população latino-americana)¹⁰² em contraste com a incidência estimada de alergia ao leite de vaca em torno de 0,5% da população adulta.¹⁰³ Esta tendência pode criar um viés diagnóstico, uma vez que cada vez mais indivíduos são rotulados como intolerantes à lactose, deixando de ser investigados apropriadamente para a alergia às proteínas do leite de vaca.

1.5.1 Reações adversas ao leite de vaca de natureza não imune

Como linhas gerais, podemos dividir as reações adversas não imunes aos laticínios em duas categorias: reações tóxico-infecciosas e reações metabólico-enzimáticas

1.5.1.1. Reações adversas de natureza tóxico-infecciosa

Laticínios (como todos os outros alimentos) podem ser fonte de contaminação alimentar por microorganismos, que produzem reações de natureza tóxica (toxinas) ou infecciosa.³³ Muitas vezes estes sintomas simulam ou se superpõem aos sintomas de outros tipos de reações adversas, mas, ao contrário das reações de natureza imunológica ou metabólico-enzimática, costumam produzir quadros agudos e auto-limitados, predominantes em sistema digestório, com sintomatologia gastrointestinal (vômitos, diarreia, cólicas intestinais) ou sistêmica (hipertermia e síndrome do choque tóxico). Esta é ainda uma visão simplificada, quando consideramos que mesmo nestas reações muitas vezes também existirá a presença de um componente imunológico associado.¹⁰⁴

1.5.1.2 Reações adversas de natureza metabólico-enzimática

Sendo o leite uma fonte de diversas biomoléculas, diversos tipos de deficiência metabólicas podem produzir quadros clínicos bem definidos seguindo-se à sua ingestão. As deficiências que causam sintomas mais graves são a galactosemia e a fenilcetonúria. A galactosemia clássica é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência da enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT, EC 2.7.7.12), que resulta no acúmulo dos metabólitos galactiol e galactose-1-fosfato. Nestes pacientes a ingestão de galactose provoca disfunção hepatocelular, disfunção renal, hipoglicemia, catarata e septicemia. A retirada da galactose da dieta reverte o quadro.¹⁰⁵ A Fenilcetonúria é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH, EC 1.14.16.1), caracterizada pela inabilidade de converter o aminoácido fenilalanina em tirosina, resultando em seu acúmulo no organismo. Pacientes com fenilcetonúria, quando não submetidos a dietas de restrição em fenilalanina apresentam desabilidade intelectual grave e anormalidades neurológicas.¹⁰⁶ Sendo os leites (materno ou bovino) ricos em fenilalanina, os mesmos devem ser proscritos da dieta.

1.5.2 A intolerância à lactose

No ser humano a lactase é geneticamente programada para ser expressa durante os primeiros anos de vida, sendo sua expressão cancelada irreversivelmente durante a adolescência (hipolactasia de início tardio).¹⁰⁷ A persistência da expressão da lactase é considerada uma mutação transmitida de maneira autossômica dominante, tendo-se identificado diversos polimorfismos associados a esta atividade.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ A intolerância à lactose resulta da ausência (temporária ou definitiva) da lactase (lactase-phlorizin hydrolase; LPH; EC 3.2.1.108), enzima presente nas microvilosidades intestinais responsável pela dissociação de lactose (galactose β -1,4 glucose) em galactose e glicose.¹¹¹ A ausência de lactase pode ser congênita, transitória ou de início tardio.⁹¹ A ausência congênita da lactase resulta na incapacidade permanente de digerir a lactose desde o nascimento (condição rara, autossômica recessiva). A hipolactasia pode ser transitória quando é secundária à uma agressão ao epitélio intestinal (condição relativamente comum em gastroenterites infecciosas ou mesmo na alergia ao leite de vaca). A intolerância à lactose apresenta sintomatologia eminentemente intestinal, com cólicas abdominais, diarreia aquosa e flatulência devido à produção de gases pela fermentação da lactose (pelas bactérias do cólon) e pelo aumento da pressão osmótica do bolo fecal (pelos monossacarídeos resultantes da fermentação).¹¹² Os sintomas são dose-dependente e estão claramente associados à ingestão da lactose do soro do leite. Derivados do leite que sofreram extração do soro (como o queijo), contêm quantidades mínimas de lactose e não desencadeiam estes sintomas.¹¹³

Mas a dinâmica da intolerância à lactose não é assim tão simples, e não se restringe aos sintomas funcionais, sendo que na prática clínica muitas vezes é difícil definir as verdadeiras causas dos sintomas, mesmo com emprego dos exames funcionais.¹¹⁴

A capacidade de digerir a lactose divide a humanidade em dois grupos fenotípicos: os capazes de digerir a lactose, também chamados de lactase-persistentes (LP), e os incapazes de digerir a lactose ou lactase-não-persistentes (LNP). A deficiência de lactase está presente em até 15% da população de descendência européia, até 80% dos latinos e afro-descendentes e em até 100% dos índios

americanos e asiáticos.¹¹³ No Brasil, cerca de 43% dos brancos e mulatos têm o alelo da persistência da lactase, sendo a hipolactasia mais freqüente entre negros e japoneses.¹⁰² Mas mesmo os lactase-não-persistentes podem se adaptar à intolerância através da flora bacteriana intestinal. A ingestão de laticínios por indivíduos lactase-não-persistentes tolerantes pode funcionar como agente modificador de risco para determinadas doenças. Em determinadas populações, existe aumento estatisticamente significativo para o risco de câncer colo-retal, câncer de próstata e colite ulcerativa (ao lado de uma diminuição significativa do risco de câncer gástrico) entre os lactase-não-persistentes que consomem laticínios regularmente.¹¹⁵ Esta é uma área que requer investigação específica uma vez que interações de ordem imune teoricamente poderiam contribuir para a modificação destes riscos. A pergunta que fica para ser respondida é se existe também uma mudança significativa no risco de desenvolvimento de alguma forma de hipersensibilidade imunológica às proteínas do leite de vaca, em função do consumo de laticínios por indivíduos lactase-não-persistente em relação aos lactase-persistente, ou em relação aos não consumidores de laticínios.

A incapacidade de digerir a lactose pode ser facilmente suspeitada em adultos ou adolescentes que desenvolvem sintomas gastrointestinais após a ingestão de leite. Pode ser confirmado pela pesquisa de acidez ou substâncias redutoras nas fezes após ingestão do leite e pela ausência de sintomas após a ingestão de leite isento de lactose. A recorrência de sintomas após a ingestão de leite regular confirma a situação definitiva da condição.⁹⁸ Outro teste laboratorial utilizado na prática clínica para o diagnóstico de intolerância à lactose é o teste de tolerância à lactose que consiste em monitorar a glicose sanguínea após uma dose oral de lactose. O teste é considerado positivo se as medidas de glicemia não demonstrarem uma elevação de 18 mg/dL entre a glicemia de jejum inicial e as glicemias consecutivas realizadas 20, 40 e 60 minutos.⁹⁵ É um teste indireto, que pode resultar em falso negativo nas pessoas que apresentam hiperinsulinismo, ou falso positivo em diabéticos. O teste do hidrogênio expirado é mais simples e mais confiável, consiste em dosar a quantidade de hidrogênio expirado em amostras de ar após a ingestão de lactose.^{93, 94} O hidrogênio livre (H₂) é produzido no intestino grosso como resultado da fermentação anaeróbica da lactose, é parcialmente absorvido para o sangue e é excretado pelos pulmões. O

padrão ouro para diagnosticar a deficiência de lactase é a medida da atividade da lactase realizada diretamente no enterócito,⁹² mas este é um teste invasivo substituível satisfatoriamente por testes funcionais menos invasivos, sendo reservado para a pesquisa. O teste genético analisa polimorfismos de cadeia única e pode ser usado em populações específicas com variantes identificadas, como descrito na Finlândia que demonstraram que o genótipo C/C₋₁₃₉₁₀ está associado com baixa atividade de lactase (< 10 U/g/proteína) e o genótipo C/T₋₁₃₉₁₀ e T/T₋₁₃₉₁₀ está associado com alta atividade.¹¹⁶ O diagnóstico pelo teste genético é específico para determinadas populações e não tem necessariamente valor quando extrapolado para outros grupos. Apesar de demonstrar o genótipo, nem sempre se correlaciona com o fenótipo. Relatam-se casos de indivíduos que apesar de não apresentarem intolerância clínica ou alteração nos testes funcionais, apresentam genótipo associados à não persistência da lactase.^{96, 117}

1.6 Reações adversas ao leite de vaca de natureza imune

As reações adversas de natureza imune são necessariamente reações de hipersensibilidade, uma vez que são reprodutíveis e desencadeadas por estímulos definidos. Por definição, são melhor denominadas de alergias. É uma situação complexa que merece uma análise cuidadosa, não somente pela ampla variedade de proteínas que podem ser responsabilizadas (individual ou coletivamente), como também pelos diferentes mecanismos de hipersensibilidade que podem estar envolvidos.⁸⁵ O simples diagnóstico de “alergia às proteínas do leite de vaca” atualmente é um diagnóstico insuficiente. É essencial que se faça a distinção pelo menos entre a hipersensibilidade às proteínas do soro do leite e às proteínas do queijo (caseínas), pois as medidas dietéticas são diferentes. Além das proteínas naturais, subprodutos do leite também podem provocar alergias, como por exemplo as fórmulas extensivamente hidrolisadas utilizadas para a nutrição de lactentes alérgicos às proteínas naturais do leite de vaca.¹¹⁸

1.6.1. Epidemiologia da alergia ao leite de vaca

A alergia ao leite de vaca é uma entidade que vem sendo identificada com cada vez maior frequência, tornando-se um desafio global para a comunidade médico-científica.¹¹⁹ Um estudo prospectivo dinamarquês com 1749 neonatos estimou a prevalência em 2,2% em crianças até três anos.¹²⁰ As alergias mediadas por IgE são responsáveis por 60% das reações relacionadas ao leite e os 40% restantes ficam por conta das reações alérgicas não mediadas por IgE. A maioria das reações mediadas por IgE envolve a pele (urticária e dermatite atópica) e a maioria das reações não mediadas por IgE envolvem o trato gastrointestinal.¹²¹

Em adultos os trabalhos envolvendo a alergia ao leite de vaca são escassos e limitados a pequenos grupos de pacientes com reações severas identificadas por testes de provocação. Descreve-se a alergia ao leite de vaca em adultos como uma entidade rara, com envolvimento de proteínas do soro e das caseínas, com boa reatividade aos testes cutâneo-alérgicos tanto ao leite integral, como às caseínas, à α -lactoalbumina, e à β -lactoglobulina (β -Lg).¹⁰³

1.6.2 Mecanismos imunes de hipersensibilidade ao leite de vaca

Existe suficiente evidência de que a alergia às proteínas do leite de vaca pode ser mediada por qualquer um dos quatro tipos básicos de reações de hipersensibilidade delineados por Gell e Coombs. Em alguns pacientes, mais de um tipo pode estar envolvido, mesmo quando existe apenas um tipo de manifestação clínica.^{91, 122}

As reações do tipo I (anafiláticas ou imediatas) são predominantemente mediadas por anticorpos da classe IgE. A interação antígeno-anticorpo na superfície dos mastócitos ou basófilos resulta na liberação da histamina e outros mediadores. Este é a reação melhor compreendida e provavelmente mais comumente envolvida nas manifestações de manifestação rápida como êmese, diarreia, dor abdominal, dermatite atópica, urticária, angioedema, rinite, broncoespasmo e anafilaxia sistêmica.⁹¹ Em função da diversidade da resposta IgE humana, nenhum alérgeno isolado ou estrutura molecular pode ser *a priori* particularmente responsabilizada pela alergenicidade do leite de vaca. A polissensibilização ocorre em 75% dos pacientes com alergia ao leite de vaca, com uma ampla variabilidade em especificidade e intensidade da resposta IgE.

Apesar de as proteínas mais freqüentemente responsabilizadas serem as que existem em maior quantidade no leite (como as caseínas e a beta-lactoglobulina), todas as proteínas do leite (mesmo as presentes em pequenos traços como a lactoferrina) são alérgenos potenciais.¹²³

Estudos em animais demonstraram também a participação de cadeias leves livres de imunoglobulinas com especificidade a caseínas bovinas na fisiopatologia da hipersensibilidade independente de IgE. Não se conhece ainda se existe uma correlação clínica para a alergia ao leite de vaca do ser humano.¹²⁴

As reações do tipo II ou citotóxicas são mediadas pela ativação do sistema complemento pelos anticorpos das classes IgG, IgM e ocasionalmente IgA. Este tipo de reação parece ser responsável pelos raros casos de trombocitopenia induzida pelo leite de vaca.⁹¹

As reações do tipo III (reações por imuno-complexos ou reação de Arthus) requerem a formação de complexos antígenos-anticorpo (com IgG, IgM, IgA e ocasionalmente IgE) e complemento. O impacto destes complexos sobre os pequenos vasos sanguíneos inicia um processo inflamatório (vasculite), cujo grau determina a extensão do dano tissular e dos sintomas. Este tipo de reação é encontrado na hemorragia induzida por leite e na rara doença crônica pulmonar induzida por leite de vaca chamada de síndrome de Heiner. Em situações menos freqüentes produz artrite ou vasculite cutânea.⁹¹

A reação do tipo IV (tardias ou mediadas por células) parece ser rara e mais difícil de documentar. Neste tipo de reação, as células T sensibilizadas proliferam e liberam uma variedade de citocinas após a exposição ao antígeno ofensor. Parecem ser concomitantes com alguns tipos de reações do tipo III na síndrome de Heiner e em alguns pacientes com gastroenteropatias.⁹¹

No entanto muitos aspectos referentes à imunorreatividade às proteínas do leite permanecem completamente não esclarecidos. Um deles é a questão dos anticorpos hemaglutinantes contra as proteínas do leite em pacientes alérgicos. Desconhece-se por completo o seu papel na fisiopatologia das intolerâncias às proteínas do leite de vaca.¹²⁵

Existem controvérsias e pendências sobre o papel dos anticorpos da classe IgG

específicos para alimentos na patogênese da alergia alimentar. Pacientes com sintomas gastrintestinais associados à ingestão de leite de vaca possuem um nível mais elevado de IgG específica para as proteínas do leite de vaca.⁹⁸ Demonstrou-se, por exemplo, que pacientes portadores de dermatite atópica possuem níveis significativamente elevados de IgG anti-beta-lactoglobulina em relação aos seus controles não portadores de dermatite atópica.¹²⁶ Sabe-se também, que sob certas condições, como um enfrentamento com anticorpos anti-IgG₄, leucócitos de pacientes sensibilizados ao leite de vaca ou a outros alérgenos são capazes de liberar histamina.¹²⁷ A interpretação deste tipo de achado levou a três tipos de conclusões aparentemente discordantes, mas que na verdade são complementares. O primeiro tipo de conclusão é que o aumento de IgG₄ específica pode ter efeito protetor nos pacientes com hipersensibilidade mediada por IgE. Esta linha de pensamento baseia-se no fato que pacientes alérgicos com níveis mais elevados da relação IgG₄/IgE são mais tolerantes à ingestão dos alimentos específicos dos que apresentam relações menores. Neste caso o IgG₄ funcionaria como “anticorpo bloqueador”¹²⁸ específico na hipersensibilidade mediada por IgE.¹²⁹ A segunda linha de pensamento sugere que a presença de IgG₄ específica seria apenas o marcador de uma experiência imunológica prévia que o paciente tenha tido com o alimento específico, sem que necessariamente este anticorpo participe da fisiopatologia ou do desenvolvimento de tolerância a este alimento. É uma linha de pensamento defendida por alguns consensos clínicos.¹³⁰ A terceira linha de pensamento sugere a participação do IgG₄ na fisiopatologia das reações de hipersensibilidade tardia não mediada por IgE, em função das alterações da relação IgA/IgG₄ vistas nestes pacientes após o desenvolvimento da tolerabilização.¹³¹ De fato, estudos recentes demonstraram que dietas de exclusão baseadas na presença destes anticorpos podem resultar em melhora clínica para os pacientes.¹³²

1.6.3 Manifestações clínicas da alergia ao leite de vaca

A clínica da alergia ao leite de vaca, por outro lado, apresenta um amplo espectro de sintomas, que podem ser predominantemente gastrintestinais, ou extra-intestinais.¹³³ Os sintomas de natureza imediata (síndrome de alergia oral, hipersensibilidade gastrointestinal imediata, anafilaxia, urticária aguda, angioedema agudo, rinite alérgica, broncoespasmo agudo) são caracteristicamente mediados por IgE. Sintomas de natureza tardia (enterocolite, proctite, hemossiderose pulmonar) são considerados como não mediados por IgE. Algumas síndromes clínicas são classificadas como de natureza mista, ou seja, estão envolvidos mecanismos mediados por IgE e mecanismos não mediados por IgE (gastroenterocolite eosinofílica, esofagite eosinofílica, asma e a dermatite atópica).⁶⁶ Outras síndromes clínicas relacionadas à alergia ao leite de vaca são de natureza ainda não elucidada, como a constipação intestinal¹³⁴ e a síndrome do umbigo vermelho,¹³⁵ ou motivo de disputa acadêmica, como o refluxo gastro-esofágico.¹³⁶ Recentemente associou-se a enterocolite necrotizante neonatal, como uma hipersensibilidade à beta-lactoglobulina.¹³⁷ Em alguns casos extremos, a própria inalação do leite foi capaz de desencadear sintomas alérgicos graves e até mesmo a morte de um indivíduo sensível.^{138, 139, 140}

1.6.4 Diagnóstico clínico da alergia ao leite de vaca

O diagnóstico da alergia ao leite de vaca baseia-se na clínica apresentada pelo paciente e por testes analíticos diagnósticos¹⁴¹ que consistem em: 1) pesquisa de IgE sérico específico para o leite integral (cru ou fervido), para o soro do leite, ou para as proteínas isoladas do leite (β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina sérica bovina e as caseínas).^{142, 143} Esta pesquisa pode ser realizada em fase líquida através de radioimunoensaio (RAST) ou por métodos enzimáticos colorimétricos (ELISA, ImmunoCAP),¹⁴⁴ ou ainda em fase sólida (imunoblote); 2) Testes cutâneos de sensibilidade imediata (com os mesmos elementos utilizados para identificação da IgE específica);^{145, 146} 3) Provas de provocação abertas ou controlados por placebo;¹⁴⁷ 4) Testes de contato patch test) para evidenciar os mecanismos celulares não mediados por IgE.¹⁴⁸ e 5) testes de enfrentamento “*ex vivo*” como o teste da inibição da migração do leucócito,^{58, 149} os testes de linfoproliferação¹⁵⁰ ou da expressão celular de citocinas

após enfrentamento antigênico *ex vivo*.¹⁵¹

1.6.5 Tratamento da alergia ao leite de vaca

O tratamento da alergia ao leite de vaca consiste primariamente na retirada do alérgeno identificado como agente sensibilizante. Neste mister é imprescindível o correto diagnóstico etiológico, uma vez que em nossa cultura o leite de vaca tem se tornado um elemento quase que essencial na alimentação infantil (e mesmo dos adultos). Várias estratégias tem sido empregadas, como a substituição do leite de vaca por extratos vegetais (como a soja), pelo leite de vaca hidrolisado (parcial ou extensamente), por fórmulas de aminoácidos e até pelo leite de outros mamíferos, como o leite de cabra ou mesmo o leite de camela, que à semelhança do leite humano não contém a β -lactoglobulina.¹⁵²⁻¹⁵⁵ Quando o paciente tem alergia apenas às proteínas do soro e não às caseínas, pode-se liberar a ingestão de queijo que não tenha soro residual.

O desenvolvimento de estratégias de dessensibilização é uma necessidade para a alteração do curso clínico promovido pelas alergias alimentares.^{156, 157} Em particular, a alergia ao leite de vaca, que em alguns casos assume um curso clínico prolongado e irresoluto.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ Protocolos para indução de tolerância oral já foram descritos com leite de vaca integral,¹⁶¹⁻¹⁶⁴ apesar do uso de antígenos naturais ter maior chance de eliciar reações alérgicas que limitem a progressão da imunoterapia.^{165, 166} Alérgenos modificados (alergóides) têm sido utilizados em protocolos de dessensibilização de maneira a minimizar as reações alérgicas produzidas pelo antígeno natural.¹⁶⁷ Proteínas com epítomos equivalentes, mas menos alergênicas, podem ser obtidas por tecnologia de recombinação gênica,¹⁶⁸ mas esta é uma metodologia cara e trabalhosa. Abordagens mais acessíveis, como o cozimento extensivo, têm sido utilizadas na suposição de que a destruição dos epítomos conformacionais podem tornar a proteína menos alergênica e, portanto, mais segura para a administração oral.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Esta desnaturação física pode, no entanto, produzir alterações químicas de difícil controle, tornando a caracterização do alergóide quase impossível, assim como pode destruir os epítomos lineares necessários para a indução do estado de tolerância.¹⁷² O desenho racional para o planejamento de um protocolo de indução de tolerância seguro e efetivo

inclui o uso de proteínas imunogênicas (que incluam os epítomos lineares relevantes), e que sejam menos alergênicas (que provoquem menos reações clínicas).¹⁷³

1.7 A β -lactoglobulina bovina

O leite de vaca possui mais de vinte proteínas dotadas de capacidade imunogênica, sendo que a frequência de envolvimento individual de cada espécie está caracterizada por alguns trabalhos.¹⁷⁴ Através de provas de provocação com proteínas isoladas Goldman caracterizou que cerca de 62% dos pacientes alérgicos ao leite de vaca são sensíveis à β -lactoglobulina; cerca de 60% são sensíveis às caseínas; cerca de 53% são sensíveis à α -lactoalbumina e cerca de 52% são sensíveis à albumina sérica bovina.¹⁷⁵

Apesar de não ser fabricada pelo ser humano, a presença de β -lactoglobulina no leite humano foi descrita após a sua detecção através de ELISA utilizando anticorpos policlonais de coelho anti- β -lactoglobulina purificados por cromatografia de afinidade.¹⁷⁶ Esta presença não foi confirmada quando as detecções foram realizadas por imunoblotte utilizando-se anticorpos monoclonais anti- β -lactoglobulina,¹⁷⁷ ratificando as suspeitas de que a técnica de ELISA com anticorpos policlonais apresentava resultados falso-positivos devidos à imunorreatividade cruzada com proteínas do leite humano.¹⁷⁸ A β -Lactoglobulina é uma proteína globular pequena (18,4 kDa) com 162 resíduos de aminoácidos unidos por duas pontes dissulfeto, solúvel em soluções salinas diluídas (comportamento típico das globulinas) composta por 8 folhas beta antiparalelas que formam um barril beta com uma alfa hélice de 3 voltas na superfície externa e uma nona fita beta que flanqueia a primeira fita.^{179, 180}

1.7.1 A β -lactoglobulina bovina como alérgeno (Bos d 5).

A β -Lg bovina, por si mesma é um alérgeno reconhecido com nomenclatura oficial definida como “Bos d 5” (*Bos domesticus*) capaz de originar a síntese de IgE específica e desencadear reações de hipersensibilidade do tipo I de Gell e Coombs.¹⁸¹ Ao nos referir à β -Lg bovina como um alérgeno, dentro do contexto da especialidade (Alergia e Imunologia), é preferível utilizar, o termo Bos d 5.¹⁸² No entanto ao nos referirmos à β -Lg modificada (desnaturada ou polimerizada) não utilizaremos esta

nomenclatura, uma vez que se trata de uma molécula diferente, ainda não classificada na lista oficial de alérgenos.

A beta-lactoglobulina (β -Lg) é o maior componente protéico do soro do leite bovino. Sua síntese (regulada por prolactina) é realizada pelas células epiteliais da glândula mamária sendo secretada no lúmen, acumulando-se no leite. Sua concentração é em torno de 3g/L de leite de vaca. Pertence à superfamília das proteínas ligantes de lipídios chamadas de lipocalinas. A β -Lg bovina é uma das proteínas ligantes de lipídios mais bem estudada e caracterizada. Liga-se a uma ampla variedade de moléculas, incluindo o retinol e seus análogos, o beta-caroteno, ácidos graxos (saturados e insaturados com comprimento de cadeia de 12 a 18 carbonos) e hidrocarbonetos alifáticos.¹⁸³ Estes ligantes unem-se ao cálice central do β -barrel dependendo da abertura pH-regulada da alça EF que serve como “opérculo” da entrada do sítio de ligação.¹⁸⁴

Existem duas variantes descritas da β -Lg bovina a variante A (B-LgA) e a variante B (B-LgB). As duas diferem em dois locais: um deles é a alça flexível exposta (D64G) que produz uma alteração conformacional responsável por uma diminuição da solubilidade e propensão para uma maior propensão para a oligomerização e gelatinização. A outra diferença está em uma fita beta (V118A) localizada na cavidade da molécula. Esta diferença na seqüência altera as propriedades dinâmicas da molécula e é provavelmente responsável pela diminuição da estabilidade térmica da variante B.¹⁸⁵

A β -Lg em condições normais não é digerida pela pepsina gástrica. O cozimento extensivo (95°C por 10 minutos) reduz drasticamente a quantidade de β -Lg solubilizada, levando à sua precipitação. Quando se adiciona pepsina ao soro tratado desta forma a β -Lg é hidrolisada em poucos minutos.¹⁸⁶ Esta estabilidade na estrutura terciária da β -Lg faz com que caracteristicamente a maioria dos epítomos alergênicos da molécula, sejam de natureza conformacional.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ Demonstrou-se que a β -Lg ingerida pode ser absorvido pelo intestino humano.¹⁹⁰ A β -Lg ingerida é internalizada através de um receptor específico para lipocalinas, localizados no enterócitos (Lipocalin-Interacting-Membrane-Receptor ou LIMR).¹⁹¹ O significado desta internalização no ser humano é incerto. Uma vez absorvido para a circulação sistêmica,¹⁹² forma pequenos agregados

imunorreativos, mas não ativa complemento.¹⁹³ A β -Lg expressa epítomos conformacionais capazes de interagir diretamente com anticorpos de diferentes classes (interação proteína-proteína). A digestão péptica é capaz de destruir os epítomos conformacionais, que em pacientes alérgicos são responsáveis pelo reconhecimento da maior parte dos anticorpos (mesmo da classe IgG).¹⁹⁴ Aparentemente este é o mecanismo responsável pela maior parte das apresentações clínicas, como sugere o fato que cerca de 75% das crianças alérgicas ao leite de vaca tolera as formas culinárias do leite extensivamente cozido.¹⁹⁵ A digestão enzimática da β -Lg produz epítomos estruturais (polipeptídeos) que mantém a capacidade de ligação com anticorpos específicos.¹⁹⁶ Esta característica é capaz de explicar os raros casos de hipersensibilidade aos hidrolisados protéicos.¹⁹⁷ A digestão intracelular da β -Lg gera epítomos lineares reconhecíveis pelo receptor da célula T quando ligado à molécula MHC de classe II no contexto da apresentação antigênica restrita (interação célula-célula).¹⁹⁸ Deste modo, as alterações conformacionais realizadas na molécula protéica (como por exemplo, a polimerização) são potencialmente capazes de alterar o componente humoral da imunorreatividade, mas provavelmente não vão alterar a imunorreatividade mediada por células desencadeada por epítomos lineares.¹⁹⁹ Após ser digerida, a β -Lg pode originar pelo menos sete peptídeos capazes de serem reconhecidos pelo receptor de célula T no contexto da apresentação de antígeno via MHC II.²⁰⁰

1.7.2 A β -lactoglobulina bovina polimerizada

1.7.2.1 A β -lactoglobulina bovina polimerizada pela transglutaminase

A indústria alimentícia vem utilizando há algum tempo, enzimas microbianas para alterar a consistência do alimento original, através da polimerização das proteínas.²⁰¹ Uma destas técnicas é o tratamento com a transglutaminase.¹⁰¹ A transglutaminase microbiana (TG) começou a ser usada na indústria alimentícia para preparação de alimentos como o kamaboko, uma pasta de peixe tradicional no Japão. A realização de algumas pesquisas pelos laboratórios de pesquisa alimentar em Kawasaki (Life Science

Laboratories) da Ajinomoto no Japão, no final dos anos 80, incentivou seu uso para outras aplicações. Este grupo isolou e purificou a transglutaminase microbiana do *Streptovorticillium mobaraense*, utilizada culinariamente em restaurantes e industrialmente na produção de queijos e iogurte.²⁰² Uma das principais ações da transglutaminase é catalisar a ligação entre o grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina com o grupo γ -carboxamida (acila) de um resíduo de glutamina, criando uma ponte intra ou intermolecular altamente resistente à proteólise.²⁰³ Isto resulta na formação de ligações covalentes entre aminoácidos da mesma proteína e entre várias moléculas de proteínas, promovendo a sua polimerização.²⁰⁴

A transglutaminase tissular é uma enzima de múltiplas funções, agindo na apoptose, na diferenciação celular, na fusão do fibrinogênio como parte da cascata de coagulação, na formação do citoesqueleto da membrana celular. As ligações protéicas cruzadas catalisadas pela transglutaminase participam na estabilização dos corpos apoptóticos. Previnem o extravasamento do seu conteúdo e conseqüente ativação inflamatória e exposição de proteínas próprias que poderiam levar a um processo de autoimunidade.²⁰⁵ Mais preocupante, no entanto, é o fato de ser a transglutaminase um dos principais autoantígenos envolvidos na intolerância ao glúten da doença celíaca.²⁰⁶ Ainda não estamos certos dos efeitos que a ingestão desta enzima pode ter no organismo humano, que por enquanto é considerada simplesmente como “comestível”. Quando submetida aos testes recomendados pela árvore de decisões prescrita pelo grupo de especialistas da FAO/WHO em 2001, propostas para investigar imunorreatividade a proteínas resultantes da biotecnologia, mostrou-se não reagente enzimaticamente com IgE, mostrou-se suscetível à digestão péptica e não apresentou em seu seqüenciamento nenhuma coincidência maior que 5 aminoácidos com nenhum alérgeno alimentar conhecido.²⁰⁷ A transglutaminase vem sendo utilizada pela indústria alimentícia na produção de queijos e iogurtes²⁰⁸ e é comercializada por empresas como a Ajinomoto (<http://www.activatg.com/>) para cozinheiros como uma “cola de proteína” para o preparo artesanal de esculturas de alimentos, ou simplesmente para aumentar a consistência do preparado culinário (ActivaTM TG Transglutaminase). Na polimerização da β -Lg com a transglutaminase, devemos tomar o cuidado de preparar o material em ambiente livre de cálcio iônico, uma vez que o mesmo induz a agregação não covalente

da β -Lg, retardando a formação das ligações covalentes catalisadas pela transglutaminase.²⁰⁹

1.7.2.2 A β -lactoglobulina bovina polimerizada pelo calor

Como a polimerização pela transglutaminase produz polímeros de massa molecular elevada (que não penetraram nos géis de poliacrilamida planejados para a localização do monômero de β -Lg), para o imunoblote, a polimerização foi realizada por aquecimento. O aquecimento da β -Lg durante a fase de redução da amostra para desnaturação por β -mercaptoetanol estimula a formação de tetrâmeros que são localizados nos géis de poliacrilamida na faixa de 72 a 73 kDa.²¹⁰

1.7.3 A imunorreatividade contra a β -lactoglobulina polimerizada em animais

Camundongos imunizados parenteralmente com a β -Lg polimerizada pela transglutaminase na presença de cisteína demonstraram níveis séricos de IgE e IgG específicas contra a β -Lg, quantificados por ELISA, significativamente menor do que os camundongos imunizados parenteralmente com a β -Lg nativa, assim como menor detecção qualitativa observada no imunoblote após SDS-PAGE.²¹¹

1.7.4 A β -lactoglobulina polimerizada como neo-antígeno

A β -Lg polimerizada é portanto um antígeno modificado (neo-antígeno) derivado da biotecnologia, produzido pela fabricação industrial de laticínios.

As diretrizes da FAO / WHO recomendam o estudo *in vitro* e *in vivo* dos neo-antígenos derivados da biotecnologia em indivíduos sensibilizados ao antígeno original. Um dos passos desta diretriz é o estudo da imunorreatividade *in vivo* através de testes cutâneo-alérgicos realizados com os antígenos alimentares modificados em indivíduos portadores de alergia ao alimento natural.²¹²

1.7.5 A β -lactoglobulina polimerizada como alergóide

Alergóide é uma proteína modificada com o objetivo de ser utilizada em protocolos terapêuticos de dessensibilização, ou de indução de tolerância oral/sublingual.¹⁴³ O alergóide é uma proteína modificada que conserva epítomos lineares reconhecíveis pelo sistema MHC-TCR de apresentação celular de antígenos (imunogênica), mas com menos epítomos conformacionais de ligação específica com anticorpos reagínicos (com menor alergenicidade). A elaboração de alergóides através da polimerização de alérgenos naturais é realizada há algumas décadas, na tentativa de redução de sua imunorreatividade, através do tratamento do extrato original com formaldeído ou glutaraldeído.^{167, 213} Mais recentemente têm-se produzido alergóides através da tecnologia de recombinação gênica, mas esta é uma tecnologia cara e trabalhosa.¹⁶⁸ Para avaliar a alergenicidade de um antígeno modificado para fins terapêuticos, pode-se utilizar testes de provocação *in vivo* (orais ou cutâneos) ou testes *ex vivo* (como o enfrentamento antigênico *ex vivo* monitorado pelo teste de degranulação do basófilo). A avaliação da imunorreatividade mediada por células iniciada especificamente pelo alérgeno, capaz de desenvolver uma resposta imune/tolerogênica, pode ser realizada antes do tratamento através de testes de proliferação de linfócitos T²¹⁴ ou após o tratamento pela pesquisa de marcadores de imunotolerância (como IL-10 e TGF- β) em imunócitos cultivados.²¹⁵ A imunorreatividade mediada por células contra a β -Lg já foi avaliada pelo teste de inibição da migração do leucócito.^{58, 59} Nesta pesquisa, utilizamos um imunoensaio equivalente, mas tecnicamente mais simples para analisar a imunorreatividade mediada por células: o Teste da Inibição da Aderência Leucocitária (TIAL),²¹⁶ descrito originalmente para avaliar a imunidade mediada por células contra antígenos tumorais^{217, 218} e posteriormente contra a poeira doméstica, o PPD e a candidina.²¹⁹

O objetivo da utilização de alergóides é minimizar as reações produzidas pelo extrato terapêutico não modificado, ao mesmo tempo em que se preserva a imunogenicidade dos epítomos lineares T-dependentes. Estudos realizados em animais sugerem existir uma redução da antigenicidade da β -Lg polimerizada em relação à β -Lg nativa, como avaliado em camundongos.^{220, 221} Estudos conduzidos em camundongos sobre a imunogenicidade dos extratos digeridos com pepsina e pancreatina da β -Lg

polimerizada também demonstraram menor alergenicidade em relação aos extratos digeridos da β -Lg nativa.²²² Desta forma, a polimerização pela transglutaminase, na medida em que possa contribuir para a diminuição da alergenicidade, torna a β -Lg polimerizada uma molécula promissora para a composição de terapias de indução de tolerância em pacientes alérgicos ao leite de vaca.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS DA PESQUISA

2.1 Objetivos gerais da pesquisa

O objetivo principal da pesquisa é o de estudar em seres humanos o efeito da polimerização pela transglutaminase (em presença de cisteína) sobre a imunorreatividade contra a beta-lactoglobulina bovina.

O objetivo secundário é avaliar a incidência de imunorreatividade IgE-mediada contra as proteínas do leite de vaca em seres humanos adultos com hipolactasia refratária ao tratamento com dieta livre de lactose.

2.2 Objetivos específicos da pesquisa

2.2.1 Quanto à influência da polimerização pela transglutaminase (em presença de cisteína) na imunorreatividade IgE-mediada *IN VIVO* contra a β -Lg em seres humanos com hipersensibilidade ao leite de vaca.

Para avaliar em pacientes (crianças e adultos) com hipersensibilidade ao leite de vaca a **equivalência** da imunorreatividade *in vivo* contra a β -lactoglobulina polimerizada pela transglutaminase (em presença de cisteína), com a imunorreatividade *in vivo* contra a β -lactoglobulina nativa. Formulamos duas hipóteses contrapostas:

Hipótese 0: A imunorreatividade humoral *IN VIVO* contra a β -Lg polimerizada pela TG (em presença de cisteína) é equivalente à imunorreatividade humoral *IN VIVO* contra a β -Lg nativa em crianças e adultos com hipersensibilidade ao leite de vaca.

Hipótese 1: A imunorreatividade humoral *IN VIVO* contra a β -Lg polimerizada pela TG (em presença de cisteína) não é equivalente à imunorreatividade humoral *IN VIVO* contra a β -Lg nativa em crianças e adultos com hipersensibilidade ao leite de vaca.

2.2.2 Quanto à influência da polimerização pelo aquecimento na imunorreatividade IgE-mediada *IN VITRO* contra a β -Lg.

Para avaliar em pacientes com hipersensibilidade ao leite de vaca a **equivalência** da imunorreatividade *in vitro* contra a β -lactoglobulina polimerizada pelo aquecimento, com a imunorreatividade *in vitro* contra a β -lactoglobulina nativa. Formulamos duas hipóteses contrapostas:

Hipótese 0: A imunorreatividade humoral *IN VITRO* contra a β -Lg polimerizada pelo aquecimento é equivalente à imunorreatividade humoral *IN VITRO* contra a β -Lg nativa em crianças e adultos com hipersensibilidade ao leite de vaca.

Hipótese 1: A imunorreatividade humoral *IN VITRO* contra a β -Lg polimerizada pelo aquecimento não é equivalente à imunorreatividade humoral *IN VITRO* contra a β -Lg nativa em crianças e adultos com hipersensibilidade ao leite de vaca.

2.2.3 Quanto à influência da polimerização pela transglutaminase (em presença de cisteína) na imunorreatividade celular *EX VIVO* contra a β -Lg..

Para avaliar (em seres humanos - independente do status da imunidade humoral mediada por IgE) a equivalência da imunorreatividade celular contra a TgPol β -Lg com a imunorreatividade celular contra a β -Lg formulamos duas hipóteses contrapostas:

Hipótese 0: A imunorreatividade celular contra a β -Lg polimerizada pela transglutaminase em presença de cisteína é equivalente à imunorreatividade celular contra a β -Lg nativa em indivíduos sem histórico de hipersensibilidade ao leite de vaca.

Hipótese 1: A imunorreatividade celular contra a β -Lg polimerizada pela transglutaminase em presença de cisteína não é equivalente à imunorreatividade celular contra a β -Lg nativa em indivíduos sem histórico de hipersensibilidade ao leite de vaca.

2.2.4 Quanto à incidência de hipersensibilidade mediada por IgE em indivíduos adultos com hipolactasia refratária à dieta de exclusão de lactose.

Para avaliar a incidência da imunorreatividade mediada por IgE contra as proteínas do leite de vaca em seres humanos adultos com hipolactasia refratária a dieta de exclusão de lactose, formulamos duas hipóteses contrapostas:

Hipótese 0: Pacientes adultos com hipolactasia refratária à dieta de exclusão de lactose têm incidência equivalente de hipersensibilidade mediada por IgE contra as proteínas do leite de vaca do que a população tolerante ao leite de vaca.

Hipótese 1: Pacientes adultos com hipolactasia refratária à dieta de exclusão de lactose têm maior incidência de hipersensibilidade mediada por IgE contra as proteínas do leite de vaca do que a população tolerante ao leite de vaca.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Seguimos a metodologia recomendada pela Organização Mundial de Saúde (WHO) que, associada à *Food and Agriculture Organization* das Nações Unidas (FAO) elaboraram em 2001 uma nomograma voltado especificamente para a normatização das abordagens científicas que visam à caracterização da alergenicidade dos novos alimentos derivados da biotecnologia, em especial quando os alimentos modificados são fontes reconhecidas de alérgenos eliciadores de síndromes clínicas. Um dos passos descritos neste nomograma é a investigação *in vivo/ex vivo*, da alergenicidade do alimento modificado em pacientes reconhecidamente alérgicos à fonte alimentar original, sugerindo especificamente como metodologia as dosagens de imunoglobulinas da classe IgE e os testes cutâneos de sensibilidade imediata (sempre após o aval do comitê de ética em pesquisa médica da instituição de investigação científica).²¹²

Desenhamos assim um estudo caso-controle descritivo transversal para comparar de modo pareado através de diferentes técnicas diagnósticas a imunorreatividade entre a proteína natural e a proteína polimerizada. Comparamos também de forma pareada a acurácia dos diferentes testes empregados. Comparamos de maneira não-pareada os resultados dos grupos sintomáticos com os resultados de grupos controles assintomáticos.

3.1 Casuística – População de estudo

A população de referência foi a da região metropolitana de Campinas. A população alvo foram pacientes encaminhados ao Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas e pacientes atendidos em uma clínica especializada em Alergia e Imunologia. (Alergoimuno Procedimentos Médicos Ltda – CREMESP 948466) situada em Americana.

O participantes foram divididos em 5 grupos segundo a idade e características clínicas.

Grupo A

Os participantes consistiam em 56 pacientes adultos (18 do sexo masculino) com idade entre 18 a 70 anos (média = 45,4 anos; mediana = 46 anos; desvio padrão = 12,3 anos; Intervalo de confiança 95% = 42,1 a 48,7 anos) com queixas de sintomas recorrentes e/ou persistentes de natureza gastrointestinal e com diagnóstico de intolerância à lactose atendidos no ambulatório de gastroclínica e encaminhados ao Ambulatório de Imunologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Todos os pacientes tinham diagnóstico funcional de intolerância à lactose confirmado por prova de sobrecarga de lactose monitorada por variação glicêmica e/ou dosagem de H₂ expirado²²³ (delta H₂ médio = 114.3 ppm H₂; 95% CI 101.7 to 126.9).

Realizou-se anamnese e exame físico. Os sintomas referidos foram detalhados por sistemas, em especial aparelho digestório, aparelho respiratório e órgãos de revestimento (pele e mucosas). Perguntou-se de maneira específica sobre os sintomas desencadeados por ingestão de leite de vaca *in natura* e queijo.

Como elemento comum a todos os indivíduos deste grupo ressaltava-se a refratariedade à dieta de exclusão de lactose. A orientação dietética de não ingerir especificamente o leite de vaca não era suficiente para a remissão dos sintomas gastrointestinais (100% dos pacientes), que persistiam mesmo quando o paciente permanecia por longos períodos sem consumi-lo. Além disso, alguns pacientes associavam claramente os sintomas ao uso de laticínios com teor mínimo de lactose (18 pacientes = 32,1%) e, em 26 pacientes (46,4%) existiam sintomas extra-intestinais relacionados à ingestão de laticínios.

GRUPO B (controle)

Como controle para comparação com os resultados do imunoblote do grupo A foram selecionados 20 pacientes atendidos em um ambulatório de Alergia e Imunologia que relatavam inequívoca tolerância à ingestão do leite de vaca e apresentavam testes cutâneos não reagentes para a β -Lg nativa e polimerizada e pesquisa de IgE específica contra β -Lg indetectável ao ImmunoCAP. Os participantes consistiam em 20 pacientes (6 do sexo masculino) com idade entre 4 a 62 anos (média = 21,9 anos; mediana = 17,5 anos; desvio padrão = 17,6 anos; intervalo de confiança 95% = 13,6 a 30,1anos).

Nenhum deles apresentava sintomas gastrointestinais, sendo acompanhados por quadros respiratórios (rinite) ou por quadros cutâneos (dermatite atópica e urticária). Neste grupo selecionado realizou-se coleta de sangue para realização de pesquisa de IgE específica contra β -Lg através de SDS-PAGE e imunoblote.

GRUPO C

Os participantes consistiam em 22 crianças (14 do sexo masculino) com idade entre 6 e 95 meses (média = 30,6 meses; mediana = 22,5 meses, desvio padrão = 27,1 meses; intervalo de confiança (95%) = 18,5 a 42,6 meses) com história clínica convincente de reação de hipersensibilidade ao leite de vaca. Todos os indivíduos apresentavam IgE específica para beta-lactoglobulina $\geq 1.2 \text{ kU L}^{-1}$ quantificada por CAP Systems Pharmacia.

GRUPO D (controle)

Os participantes consistiam em 22 crianças (13 do sexo masculino) com idade entre 6 e 93 meses (média = 30,8 meses; mediana = 22,5 meses; desvio padrão = 26,8 meses; Intervalo de confiança (95%) = 18,9 a 42,7 meses) selecionadas por sua inequívoca tolerância à ingestão de leite de vaca e ausência de IgE específica para β -Lg quando pesquisada por ImmunoCAP. Nenhum deles apresentava sintomas gastrointestinais, sendo que, ou eram assintomáticos (5 participantes) ou apresentavam-se apenas com sintomas respiratórios superiores leves (rinite). Este grupo foi pareado com o grupo C e serviu como controle dos testes cutâneo-alérgicos.

GRUPO E

O grupo E foi constituído para comparar a imunorreatividade mediada por células contra a β -Lg e a TgPol β -Lg. Escolhemos indivíduos tolerantes ao leite de vaca, para que a hipersensibilidade humoral contra a beta-lactoglobulina não fosse um interferente nos enfrentamentos celulares. Consistiu de 49 pacientes (19 homens, idade média 28,7 anos, desvio padrão 20,6 anos) acompanhados em uma clínica especializada em Alergia e Imunologia com diagnóstico de alergia respiratória (rinite e asma). Amostras de sangue fresco foram coletadas destes pacientes para realização

do Teste de Inibição da Aderência Leucocitária (TIAL).

3.2 Métodos diagnósticos

3.2.1 Testes diagnósticos *in vivo*

Os testes cutâneo-alérgicos de sensibilidade imediata são procedimentos médicos codificados pela tabela da Associação Médica Brasileira sob número 19.010.11-7 e são rotineiramente utilizados como procedimento diagnóstico nos serviços de Alergia e Imunologia. Seu uso no diagnóstico de alergias alimentares também está bem estabelecido²²⁴, assim como o uso das proteínas isoladas do leite de vaca.^{146, 225} A análise da reatividade se faz por planimetria da pápula palpável resultante. Considera-se o tamanho em milímetros do maior diâmetro da pápula palpável somado ao diâmetro de sua perpendicular, posteriormente dividido por dois. Obtém-se assim o diâmetro papular médio (DPM).²²⁶

O teste cutâneo-alérgico de leitura imediata foi realizado pela técnica de puntura (skin prick test) na face volar do antebraço com uma lanceta de acrílico descartável, estéril, com uma ponta circular de 1 mm de comprimento sobre uma base romba (Punctor[®], adquirida da *Alko do Brasil Ind. Com. Ltda*, São Paulo, SP, Brazil). A lanceta foi introduzida através de uma gota de extrato de antígeno em um ângulo de 90° perpendicular à pele, retirada após 5 segundos e descartada. Uma reação com DPM \geq 3 mm, mensurada 15 minutos após a aplicação do puntor sobre a solução testada e após subtração da reação correspondente do controle negativo foi requerida para positividade. A reatividade do teste cutâneo foi conferida com o uso de estratos comerciais diluídos em solução glicerosalina de leite de vaca 20% peso/volume, alfa-lactoalbumina bovina 20% peso/volume, caseína bovina 20% peso/volume, leite de cabra 20% peso/volume e extrato de proteína de soja 20% peso/volume adquiridos de FDA Allergenic, Rio de Janeiro, Brasil. Beta-lactoglobulina (β -Lg) com 95% pureza foi fornecida na forma liofilizada por Davigisco Foods Inc. (Le Sueur, MN, USA) e diluída a 20% peso/volume em solução glicerosalina 20% volume/volume. A beta-lactoglobulina bovina polimerizada (TgPol β -Lg) foi preparada por meio da ação enzimática da transglutaminase microbiana na presença de cisteína no Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de

Campinas. Utilizamos β -Lg nativa na concentração de 0,7 mg/ml por corresponder a 10.000 PNU/ml mensurado pelo método de Kjeldahl²²⁷ (AOAC 991.22)²²⁸ e TgPol β -Lg na concentração de 0,9 mg/ml (correspondendo a 10.000 PNU/ml mensurado pelo método de Kjeldahl).

O controle positivo foi realizado com histamina (1 mg/ml), e o controle negativo com solução glicerinada diluída em salina isotônica (20% volume/volume). Como controle de reatividade os componentes adicionais da beta-lactoglobulina polimerizada foram testados individualmente: transglutaminase (TG) 0,02 mg/ml em salina glicerinada a 20% e a cisteína 0,038 mg/ml em salina glicerinada a 20%.

Após a medida do diâmetro da pápula, a mesma foi demarcada com caneta dermatográfica e a marcação transferida com auxílio de uma fita adesiva transparente para uma folha de papel.

3.2.2 Ensaios analíticos *in vitro* e *ex vivo*

Para o imunoblote e ImmunoCAP, uma amostra de sangue de 8 mL foi colhida em tubo de coleta com ativador de coagulação e gel separador. Após centrifugação por 20 minutos a 2500 rpm o soro sobrenadante foi armazenado em freezer a -80°C .

Para o teste de inibição da aderência leucocitária, colhe-se uma amostra de sangue de 8 mL em tubo heparinizado, imediatamente colocado em banho térmico a 37°C para sedimentação.

3.2.2.1 Dosagem de IgE específica por ImmunoCAP

Realizou-se a dosagem de IgE específica contra a beta-lactoglobulina por sistema automatizado “CAP Systems Pharmacia” (Uppsala, Suécia) e os resultados expressos como kU/mL. Dosagens maiores do que 0,35 kU/mL foram consideradas significativas para sensibilização.

3.2.2.2 Pesquisa de IgE específica por SDS-PAGE e imunoblote

Para pesquisa de IgE específica em fase sólida contra a beta-lactoglobulina, procedeu-se a preparação de gel de gradiente em poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) utilizando o sistema BioRad Mini Protean Tetra-cell system (BioRad, Hercules, CA, USA) com gel de poliacrilamida em gradiente contínuo (5%T - 20%C resolving gel).²²⁹ Amostras de β -Lg purificada (5 mg/mL) foram preparadas em tampão contendo 2% SDS e 5% mercapto-etanol e aquecidos por 10 minutos a 90°C para desnaturação e exposição de resíduos para ionização. Uma alíquota de 5 μ L, equivalente a 25 μ g de proteína foi aplicada a cada poço. Para identificação aproximada dos pesos moleculares utilizou-se um padrão de proteínas pré-corado de 10; 17; 26; 34; 43; 55; 72; 96; 130; 170 kDa (PageRuler®, Fermentas, Hanover, MD, USA). A corrida eletroforética foi estimulada com 80 Volts até a visualização da coluna de proteínas atingir a metade do gel sendo depois estimulada com 120 Volts até as proteínas atingirem o fim do gel. Após a corrida eletroforética, as proteínas distribuídas no gel de poliacrilamida são transferidas por arraste eletroforético (blot) para uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 μ m em sistema de imersão por 15 minutos a 150 mA. Após a transferência as membranas são imersas em solução de gelatina por duas horas para saturar os locais adicionais de ligação protéica da nitrocelulose. As membranas de nitrocelulose transferidas com a beta-lactoglobulina são seccionadas em seções verticais delimitando cada corrida. Cada secção é incubadas *overnight* com o soro de um paciente (50 μ L em 3 mL de PBS), a 4 °C em agitação pendular de 5 ciclos por minuto. As secções das membranas de nitrocelulose são lavadas em tampão de lavagem (Tween a 0,05% em PBS) por três vezes e a seguir incubadas com IgG de cabra anti-IgE humano (15 μ L em 3mL de PBS) em agitação pendular, em temperatura ambiente, por duas horas. As secções das membranas de nitrocelulose são lavadas em tampão de lavagem por três vezes e a seguir incubadas com anticorpo de coelho anti-IgG de cabra, conjugado em sua porção Fc com peroxidase do rábano (15 μ L em 3 mL de PBS), em agitação pendular, em temperatura ambiente, por duas horas. As secções das membranas de nitrocelulose são lavadas em tampão de lavagem por três vezes e a seguir reveladas em solução de diaminobenzidina (DAB) a 0,5% em PBS por quinze minutos, adicionando-se após

alternadamente H_2O_2 (400 μ L para 6mL de H_2O) e solução colorimétrica com $NiSO_4$ e $CoCl_2$ (0,5g + 0,5g em 50 mL H_2O) até o aparecimento das bandas, quando a reação é interrompida com H_2O .²³⁰ A leitura é realizada por digitalização das imagens através do software para análise densitométrica *ImageJ* (disponibilizado no site <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). A digitalização das imagens é realizada em escala de cinza. O software de leitura oferece o recurso de inverter a imagem, de modo a tornar a leitura proporcional à marcação. A leitura da densidade óptica é realizada circunscrevendo-se individualmente cada banda. Para corrigir a interferência da tonalização da membrana de nitrocelulose pelo processo de revelação, faz-se para cada leitura individual a correção, que consiste em subtrair da leitura da banda, a leitura do “background” correspondente, ou seja, uma área com as mesmas dimensões, definida pelo usuário nas imediações da banda.²³¹

Para controle de qualidade do blot do grupo C (controle) alocou-se em uma das secções de membrana, no mesmo banho de incubação, o soro de um paciente do grupo A sabidamente reativo contra a β -Lg e que demarcou banda após a revelação, validando o ensaio analítico.

Para pesquisa de IgE específica em fase sólida contra as proteínas do leite de vaca, empregou-se leite de vaca desnatado (gordura zero da Molico) na concentração de 4mg/mL preparado em condições redutoras semelhantes à beta-lactoglobulina purificada, porém sem aquecimento. O restante da metodologia foi semelhante.

3.2.2.3 Enfrentamento antigênico *ex vivo* e Teste da Inibição da Aderência Leucocitária

O teste de inibição da aderência do leucócito é um procedimento artesanal descrito em 1972 por Halliday para detecção de antígenos tumorais e fatores bloqueadores envolvidos na imunidade mediada por células.²¹⁷ Tem similaridade com o correlato teste de inibição da migração do leucócito.^{216, 232} São testes descritos para a detecção de imunorreatividade celular responsiva à presença de antígenos e anticorpos específicos.^{233, 234} Há relatos na literatura do seu uso na detecção de imunorreatividade contra antígenos tumorais,²³⁵ e contra alérgenos exógenos, como

por exemplo, a poeira doméstica, a candidina, o PPD,²¹⁹ dermatófitos responsáveis por infestações cutâneas crônicas e recorrentes,²³⁶ a beta-lactoglobulina bovina⁵⁸ e o glúten²³⁷. A não-aderência do leucócito ao vidro induzida pelo enfrentamento com antígenos específicos depende basicamente de mecanismos celulares²³⁸ nos quais estariam envolvidos diversos tipos de células, mas principalmente os linfócitos T.²³⁹⁻²⁴² Quando ativados pela presença do antígeno específico, os linfócitos liberariam fatores solúveis encontráveis no sobrenadante (hipotetizados como: Fator de Inibição da Migração do Leucócito e Fator de Inibição da Aderência do Leucócito) que agiriam sobre os leucócitos inibindo a migração e conferindo a propriedade de não-aderência ao vidro, respectivamente.²¹⁸ O envolvimento dos linfócitos T foi sugerido pela observação de que a presença de anticorpos murinos anti- θ (anti-theta) cancela a inibição da aderência,^{243, 244} e que linfócitos formadores de e-rosetas são essenciais para o aparecimento do fenômeno da não aderência ao vidro.²³⁹ Como os linfócitos T não são capazes de ligar-se diretamente ao antígeno (sendo dependentes da apresentação antigênica dentro do contexto TCR-MHC II), fica evidente que outras células ou outros componentes estão envolvidos. Plaquetas, em especial, também foram implicadas na produção de fatores inibidores da aderência do leucócito ao vidro.²⁴⁵ Não se obteve ainda de maneira satisfatória todos os mecanismos celulares e as citocinas envolvidas neste processo, porém demonstrou-se que os leucotrienos, e em especial o LTC₄, são fatores participantes do processo²⁴⁶ modulados pela secreção de interferon²⁴⁷ e inibidos por bloqueadores de cálcio como o verapamil, o cetotifeno e cromoglicato dissódico.²⁴⁸

Leucócitos obtidos de amostras de sangue heparinizado obtidos por venopuntura do antebraço são separados do sangue fresco por sedimentação a 37°C por uma hora. Alíquotas de 100 μ L de plasma são incubados com 10 μ L das mesmas soluções utilizadas para os testes cutâneos (β -Lg 0,7mg/mL 20%GS e TgPol β -Lg 0,9mg/mL 20%GS) por 30 minutos em agitação suave (200 rpm). De maneira semelhante, é processada uma alíquota para controle (sem antígeno). Após a incubação, o plasma é alocado em uma câmara hemocitométrica não metalizada por 2 horas em ambiente úmido a 37°C para permitir a aderência dos leucócitos. Os leucócitos são contados, a câmara hemocitométrica é imersa em um béquer com PBS

a 37°C, durante esse processo a lamínula é gentilmente retirada, sendo colocada uma nova, os leucócitos são contados novamente nos mesmos campos da contagem pré-lavagem. A Taxa de Aderência (TA) ou porcentagem de aderência é calculada como a contagem de leucócitos após a lavagem dividido pelo número de leucócitos contados antes da lavagem e multiplicado por 100%. A Taxa de Inibição da Aderência (TIA) é calculada pela proporção entre a taxa de aderência da amostra submetida ao enfrentamento antigênico *ex vivo* e a taxa de aderência da amostra controle, segundo a fórmula: $TIA = [1 - (TA \text{ amostra enfrentada} / TA \text{ amostra controle})] \times 100\%$.

3.3 Análise estatística

Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (version 5.0; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Os dados foram relatados como médias aritméticas e intervalo de confiança de distribuição (IC) de 95%.

As variâncias das médias das diferenças entre os resultados pareados foram analisadas por teste t pareado. Seguindo o desenho de estudo caso-controle retrospectivo montamos tabelas de contingência para avaliar entre os grupos o desempenho diagnóstico comparativo dos testes empregados. A significância das diferenças foi analisada pelo teste exato de Fisher e pelo teste do Chi-quadrado.

Para todas as análises um valor p menor do que 0,05 foi considerado significativo.²⁴⁹⁻²⁵¹

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Pacientes adultos do grupo A

4.1.1 Características clínicas do grupo A

As características clínicas dos participantes deste grupo estão expostas na tabela 1 (pg 58) O escore atribuído refere-se à percepção da associação entre a ingestão de laticínios e o início dos sintomas e foi assim determinado:

0: ausência do sintoma;

1: Presença do sintoma, mas sem relação temporal com a ingestão de laticínios;

2: Relaciona o aparecimento do sintoma com ingestão de leite de vaca, mas não com ingestão de queijo;

3: Relaciona o aparecimento de sintomas com ingestão de leite de vaca e com ingestão de queijo.

4.1.2 Dosagem de IgE específica contra beta-lactoglobulina

Dos 56 pacientes estudados, 20 (35,7%) apresentaram IgE contra β -Lg > 0,35 kU/mL mensurado através do ImmunoCAP. Destes 20 pacientes, os resultados variaram de 0,4 kU/mL a 15,4 kU/mL, a média foi de 3,5 kU/mL e o IC = 1,5 kU/mL a 5,5 kU/mL.

Considerando apenas os 45 pacientes com imunoblote positivo contra a beta-lactoglobulina, 19 pacientes (42,2%) apresentaram IgE contra β -Lg > 0,35 kU/mL através do ImmunoCAP.

Considerando os 45 pacientes com imunoblote positivo os resultados variaram de 0,4 kU/mL a 15,4 kU/mL, a média foi de 2,7 kU/mL; o IC = 1,9 kU/mL a 3,4 kU/mL.

Considerando apenas os 19 pacientes com imunoblote positivo e IgE específica detectável, os resultados variaram de 0,4 kU/mL a 15,4 kU/mL, sendo a média aritmética igual a 3,6 kU/mL e o IC = 1,5 kU/mL a 5,7 kU/mL.

Tabela 1 Características clínicas dos 56 pacientes do grupo A.

TGI: Sintomas gastrointestinais;
URT: Urticária;
DA: Dermatite atópica;
RA: Rinite alérgica;
ENX: Enxaqueca.

O Escore refere-se à percepção do paciente da associação entre a ingestão de laticínios e o início dos sintomas:

- 0: ausência do sintoma;
- 1: Presença do sintoma, mas sem relação temporal com a ingestão de laticínios;
- 2: Relaciona o aparecimento do sintoma com ingestão de leite de vaca, mas não com ingestão de queijo;
- 3: Relaciona o aparecimento de sintomas com uso de Leite de vaca e com uso de queijo.

Iniciais	Idade	TGI	URT	DA	RA	ASMA	ENX
AAM	46	1	0	0	1	0	0
ACR	57	3	0	0	0	0	0
AG	46	3	0	0	1	0	0
APS	45	2	0	0	0	0	0
APSS	54	3	0	0	0	0	0
BLOG	51	2	0	0	1	1	0
CADN	42	2	0	0	0	0	0
CF	48	2	0	0	1	1	0
CPS	32	2	0	0	0	0	0
DH	34	2	0	0	0	0	0
ERS	47	3	0	0	1	0	0
FAL	26	3	0	1	0	1	0
FSE	18	3	0	0	0	0	0
GD	53	2	0	0	0	0	0
GMT	39	3	1	0	0	0	0
GRC	46	2	0	1	1	0	0
GSS	55	2	0	0	0	0	0
HRG	42	2	0	0	1	0	0
IEE	65	1	0	0	0	0	0
ISRC	53	2	0	0	0	0	0
JGMC	48	1	0	0	0	0	0
JNJ	58	3	0	0	1	0	0
JNJ	49	2	0	0	0	0	0
JVF	59	2	0	0	0	0	3
KRO	43	2	0	0	0	0	0
LAP	28	2	0	0	0	0	0
LCB	39	3	0	0	0	0	0
LHYDC	55	2	0	0	0	0	3
MAF	51	3	1	1	1	1	0
MCCS	42	1	0	0	0	0	0
MCNM	52	3	0	0	0	0	0
MCSS	36	3	0	0	1	0	0
MEF	22	2	0	0	1	0	0
MFA	41	3	0	0	1	0	0
MGSG	56	3	0	1	1	0	0
MLJA	58	1	0	0	0	0	0
MLMSB	56	2	0	0	1	0	0
MNP	29	3	0	0	0	0	0
MOF	44	3	0	0	0	0	0
MRBT	48	3	0	1	1	1	3
MROF	70	3	0	0	1	0	0
MSN	64	1	0	0	0	0	0
MTJ	62	1	0	0	0	0	0
MZP	61	1	0	0	0	0	0
NZ	40	3	0	0	0	0	0
PRBF	50	2	0	0	0	0	0
RCN	63	2	0	0	1	1	0
RSL	23	1	0	0	0	0	0
SAMC	46	2	3	0	0	0	0
SAP	57	2	1	0	1	0	0
SARR	38	2	1	0	1	1	0
STMC	40	2	0	0	1	0	0
TCPB	22	2	0	0	1	0	0
VAS	21	2	1	0	0	0	0
VLA	33	1	1	0	1	1	0
WBA	41	2	0	0	0	0	0

4.1.3 Testes cutâneo-alérgicos

Os resultados dos testes cutâneos e a dosagem de IgE específica através de ImmunoCAP estão registrados nas tabelas 2 e 3 (páginas 60 e 61).

4.1.3.1 Beta-lactoglobulina nativa

Dos 56 pacientes testados, 31 (55,4%) demonstraram reações cutâneas à β -Lg (destes 31, a média dos DPM foi 4,6 mm; IC = 4,0 mm a 5,0 mm).

Considerando a totalidade dos 56 pacientes, a média dos DPM foi de 2,5 mm; o IC = 1,9 mm a 3,2 mm. Vide figura 2 na página 62.

Considerando apenas os 45 pacientes com imunoblote positivo contra a beta-lactoglobulina, 26 pacientes (56,5%) apresentaram reatividade cutânea contra a β -Lg. Destes 45 pacientes, a média dos DPM foi de 2,7 mm; o IC = 1,9 mm a 3,4 mm. Vide figura 3 na página 62.

A média dos diâmetros papulares para o controle positivo neste grupo de 45 pacientes foi de 6,8 mm; 95% o IC = 6,2 mm a 7,3 mm.

4.1.3.2 Beta-lactoglobulina polimerizada por transglutaminase.

Dos 56 pacientes testados, 24 (42,9%) demonstraram reações cutâneas à TgPol β -Lg. Destes 24 pacientes, a média dos DPM foi de 4,0 mm; IC = 3,5 mm a 4,5 mm.

Considerando a totalidade dos 56 pacientes, a média dos DPM foi de 1,7 mm; o IC = 1,1 mm a 2,3 mm. Vide figura 2 na página 62.

Considerando apenas os 45 pacientes com imunoblote positivo contra a beta-lactoglobulina, 19 pacientes (41,3%) apresentaram reatividade cutânea contra a β -Lg polimerizada por transglutaminase em presença de cisteína.

Destes 45 pacientes a média dos DPM foi de 1,6 mm; o IC = 1,0 a 2,2 mm. Vide figura 3 na página 62.

A média das diferenças entre a imunorreatividade cutânea contra a β -Lg nativa e a TgPol β -Lg foi significativa ao teste t pareado ($p < 0,05$).

Tabela 2 Resultados dos testes cutâneos e do ImmunoCAP nos 56 pacientes do grupo A.

F77: dosagem de IgE-específico contra β -Lactoglobulina (β -Lg) por ImmunoCAP;

CP: Diâmetro papular médio (DPM) para o teste cutâneo de leitura imediata (TCLI) para o controle positivo (histamina 1 mg/mL);

β Lg: DPM do TCLI para β -Lg;

P β L: DPM do TCLI para β -Lg polimerizada pela transglutaminase em presença de cisteína;

VAC: DPM do TCLI para extrato de leite de vaca;

ALF: DPM do TCLI para extrato comercial de alfa-lactoalbumina;

CAS: DPM do TCLI para extrato comercial de casína bovina;

SOJ: DPM do TCLI para extrato comercial de proteínas da soja;

CAB: DPM do TCLI para extrato comercial de leite de cabra;

Δ H₂: diferença na excreção de hidrogênio inicial e final no teste do H₂ expirado.

Pac	F77	CP	β Lg	P β L	VAC	ALF	CAS	SOJ	CAB	Δ H ₂
AAM	0,00	5	4	4	5	0	0	0	0	102
ACR	0,62	10	5	0	0	5	6	0	4	132
AG	0,00	5	5	3	5	0	5	7	3	164
APS	0,55	7	4	0	6	0	5	0	6	100
APSS	0,00	7	4	0	5	0	0	4	0	74
BLOG	0,00	8	5	0	6	4	5	5	5	57
CADN	0,00	6	4	4	5	4	0	4	5	54
CF	0,54	8	4	4	5	0	0	0	5	74
CPS	0,00	7	0	0	4	4	0	0	4	33
DH	0,00	6	3	3	4	3	3	4	4	203
ERS	12,60	6	0	0	8	7	4	6	0	124
FAL	0,00	11	0	3	5	5	3	4	3	77
FSE	2,08	9	0	0	0	0	0	0	0	110
GD	0,00	5	0	4	4	0	3	4	4	67
GMT	0,00	8	0	0	5	3	3	3	3	108
GRC	1,20	6	0	0	0	0	0	0	0	134
GSS	5,20	5	0	0	0	0	3	0	0	96
HRG	0,00	9	0	3	0	0	0	0	0	114
IEE	0,00	5	0	0	0	0	0	0	0	82
ISRC	0,00	6	5	0	0	0	0	8	0	84
JGMC	15,43	5	3	0	5	0	0	4	5	148
JNJ	0,00	6	0	0	5	0	4	0	0	162
JNJ	4,01	6	0	0	0	0	7	0	0	130
JVF	0,41	6	4	5	4	0	0	0	0	120
KRO	0,46	6	4	4	4	0	4	4	4	125
LAP	0,00	9	0	0	0	0	0	0	0	64
LCB	4,04	6	3	3	6	4	4	5	4	160
LHYDC	0,00	7	0	0	0	0	4	0	0	91
MAF	0,00	7	3	0	4	4	3	4	4	162
MCCS	9,16	9	9	6	4	6	3	0	0	150
MCNM	1,82	8	5	5	5	0	4	4	7	86
MCSS	0,00	8	3	3	4	3	3	4	0	84
MEF	0,00	7	4	0	0	0	0	0	0	158
MFA	1,20	7	6	3	0	3	0	0	0	NT
MGSG	0,00	7	6	4	5	3	4	5	6	29
MLJA	0,00	4	0	4	7	0	3	3	0	181
MLMSB	0,00	8	4	0	0	0	0	0	0	167
MNP	0,00	6	4	4	0	4	4	4	4	59
MOF	0,39	7	0	0	0	0	0	0	0	82
MRBT	0,00	6	5	3	0	3	0	0	4	160
MROF	0,00	7	4	0	6	4	4	7	6	88
MSN	4,59	5	0	0	0	0	0	0	0	183
MTJ	0,35	4	0	0	0	0	0	0	0	132
MZP	0,35	7	4	0	0	0	0	0	0	88
NZ	1,23	0	0	0	5	0	0	0	0	82
PRBF	3,78	10	6	4	4	0	0	0	0	31
RCN	0,00	8	6	0	9	0	0	0	7	180
RSL	0,00	6	5	5	5	0	4	6	10	192
SAMC	0,00	8	0	8	4	0	0	0	0	148
SAP	0,00	7	6	5	5	3	3	4	5	163
SARR	0,00	7	0	0	0	0	4	0	0	153
STMC	0,00	7	2	0	5	0	0	0	3	134
TCPB	0,00	9	4	0	4	3	3	0	4	142
VAS	0,00	7	0	3	3	3	3	4	3	181
VLA	1,60	4	0	0	0	0	3	0	0	43
WBA	0,00	4	0	0	5	0	5	0	0	136

Tabela 3 Resultados dos imunoblots dos 53 pacientes do grupo A.

s-IgE: dosagem de IgE-específico contra β -Lactoglobulina (β -Lg) por ImmunoCAP;

TCP PC: Diâmetro papular médio (DPM) para o teste cutâneo de puntura (TCP) para o controle positivo (histamina 1 mg/mL);

TCP BLG: DPM do TCP para β -Lg;

TCP PolBLG: DPM do TCP para β -Lg polimerizada pela transglutaminase em presença de cisteína;

DOC 72 kDa: Densidade Óptica média Corrigida para o tetrâmero da β -lactoglobulina;

DOC 36 kDa: Densidade Óptica média Corrigida para o dímero da β -lactoglobulina;

DOC 18 kDa: Densidade Óptica média Corrigida para o monômero da β -lactoglobulina

Paciente	s-IgE BLG	TCP PC	TCP BLG	TCP PolBLG	DOC 72kDa	DOC 36kDa	DOC 18kDa
ACR	0,6	10	5	0	37,6	16,4	0,4
APS	0,6	7	4	4	10,0	0,0	0,0
BLOG	0,0	8	5	0	20,4	0,0	0,0
CF	0,5	8	4	4	10,7	9,6	2,1
CPS	0,0	7	0	0	16,5	13,5	1,8
DH	0,0	6	3	3	21,0	8,0	6,1
ERS	12,6	9	0	0	46,6	7,0	0,0
FAL	0,0	11	0	3	18,8	9,9	0,0
FSE	2,1	6	0	0	48,8	10,2	0,0
GD	0,0	5	0	4	24,1	12,1	0,0
GMT	0,0	8	0	0	10,4	13,4	8,1
GRC	1,2	5	0	0	13,2	5,9	0,0
GSS	5,2	5	0	0	23,2	0,0	0,0
HRG	0,0	9	0	3	24,1	7,8	3,4
IEE	0,0	5	0	0	21,1	6,8	0,0
ISRC	0,0	6	5	0	23,1	12,5	0,0
JGMC	15,4	5	3	0	35,9	0,0	0,0
JNJ	4,0	6	0	0	7,6	0,0	0,0
JNJ	0,0	6	0	0	24,8	0,0	0,0
JVF	0,4	6	4	5	15,6	0,0	0,0
KRO	0,5	6	4	4	19,2	0,0	0,0
LAP	0,0	9	6	0	19,4	0,0	0,0
LCB	4,0	6	3	3	14,6	0,0	0,0
LHDC	0,0	7	0	0	25,9	0,0	0,0
MAF	0,0	7	3	0	16,4	0,0	0,0
MCCS	9,2	9	9	6	21,0	0,0	0,0
MCNM	1,8	8	5	5	24,3	12,2	12,5
MCSS	0,0	8	3	3	10,5	9,2	0,0
MEF	0,0	7	4	0	7,1	0,0	0,0
MFA	1,2	7	6	3	12,0	0,0	0,0
MGSG	0,0	7	6	4	12,2	12,2	12,5
MLJA	0,0	4	0	4	17,0	0,0	0,0
MLMSB	0,0	8	4	0	19,9	0,0	0,0
MNP	0,0	6	4	4	10,9	0,0	0,0
MOF	0,4	7	0	0	9,8	0,0	0,0
MRBT	0,0	6	5	3	20,4	0,0	0,0
MROF	0,0	7	4	0	8,2	0,0	0,0
MSN	4,6	5	0	0	10,0	0,0	0,0
MZ	1,2	0	0	0	11,7	5,8	4,4
MZP	0,0	7	4	0	14,6	0,0	0,0
PRBF	3,8	10	6	4	5,5	5,4	0,0
RCN	0,0	8	6	0	5,0	0,0	7,3
RSL	0,0	6	5	5	14,1	0,0	0,0
SAMC	0,0	8	0	0	6,0	3,5	13,9
SARR	0,0	7	0	0	7,2	0,0	0,0

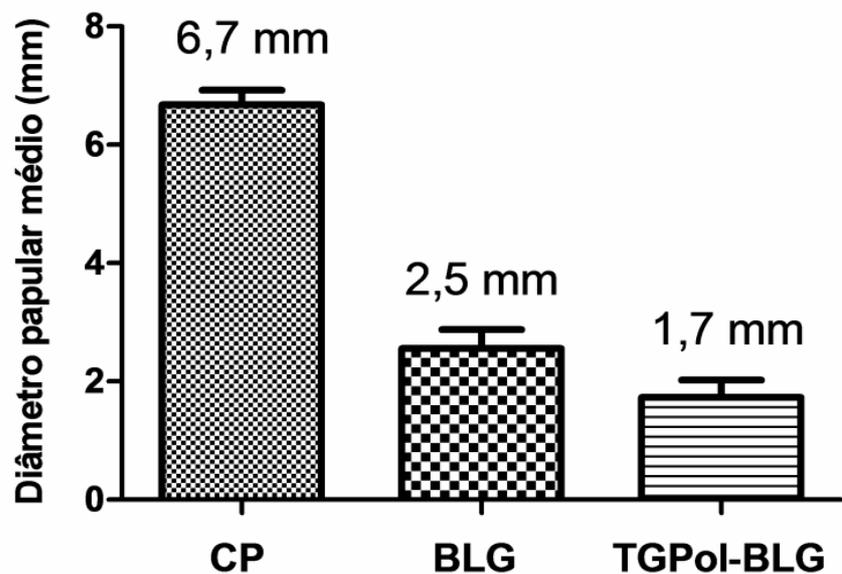


Figura 2 Média dos diâmetros papulares médios obtidos por teste de puntura dos 56 participantes do grupo A. CP: controle positivo (histamina 1mg/mL); BLG: Beta-Lactoglobulina nativa e TGPol-BLG: Beta-Lactoglobulina polimerizada por transglutaminase em presença de cisteína.

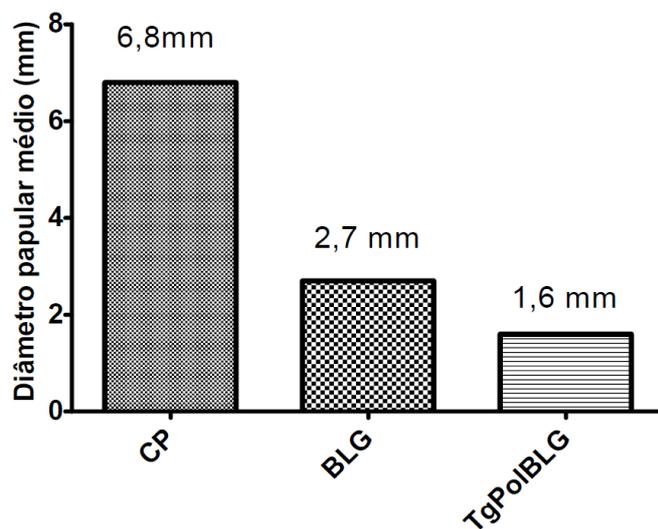


Figura 3 Média dos diâmetros papulares médios obtidos por teste de puntura dos 45 participantes do grupo A com imunoblot reagente para IgE específico contra a β -Lactoglobulina. CP: controle positivo (histamina 1mg/mL); BLG: Beta-Lactoglobulina nativa e TGPol-BLG: Beta-Lactoglobulina polimerizada por transglutaminase em presença de cisteína.

4.1.3.3 Comparativo entre as sensibilidades analíticas categóricas

Tabela de contingência entre ImmunoCAP e SPT com β -Lg no grupo A

	Submetidos ao teste	Positivos
ImmunoCAP	45	19
Testes Cutâneos	45	26

As diferenças não foram significantes quando submetidas ao teste do Chi-quadrado ($p = 0,39$) e ao teste de Fisher ($p = 0,46$)

Considerando apenas os 45 pacientes com imunoblote positivo contra a beta-lactoglobulina, a combinação de resultados positivos para a reatividade cutânea para a β -Lg nativa e TgPol β -Lg foi de 30 pacientes (66,6%).

Considerando apenas os 45 pacientes com imunoblote positivo contra a beta-lactoglobulina, a combinação de resultados positivos para a reatividade cutânea para a β -Lg nativa e o ImmunoCAP foi de 34 pacientes (75,5%).

Considerando apenas os 45 pacientes com imunoblote positivo contra a beta-lactoglobulina, a combinação de resultados positivos para a reatividade cutânea para a β -Lg nativa, a reatividade cutânea contra a TgPol β -Lg e o ImmunoCAP foi de 38 pacientes (84,4%). Estes resultados estão demonstrados na figura 4 na página 64.

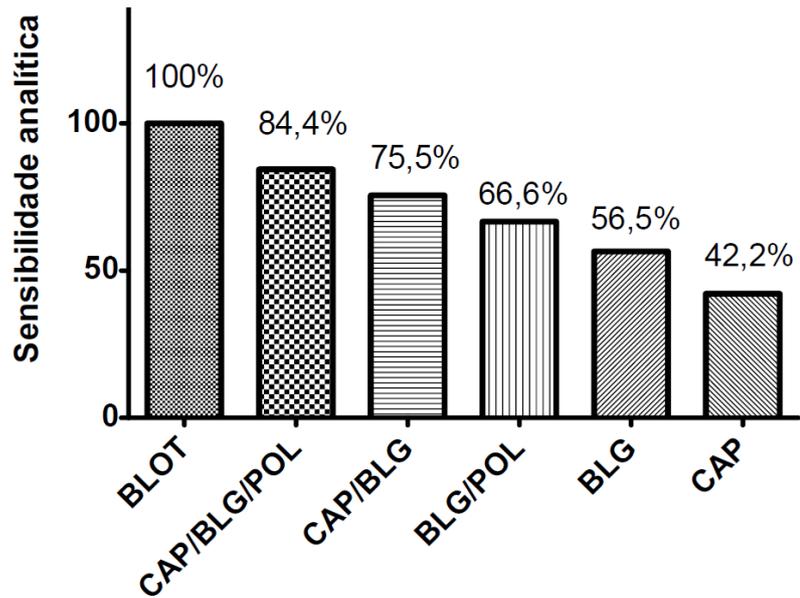


Figura 4 Sensibilidade analítica do ImmunoCAP (CAP); do teste de puntura para β -Lactoglobulina (BLG); da combinação do teste de puntura para β -Lactoglobulina nativa e polimerizada por transglutaminase em presença de cisteína (BLG/POL); da combinação do ImmunoCAP e do teste de puntura para β -Lactoglobulina nativa (CAP/BLG); da combinação do ImmunoCAP, do teste de puntura para β -Lactoglobulina nativa e polimerizada por transglutaminase em presença de cisteína (CAP/BLG/POL) para detecção de IgE específica contra a β -Lactoglobulina bovina em 45 pacientes com imunoblot positivo para IgE específico contra a β -lactoglobulina padronizado como referência (BLOT).

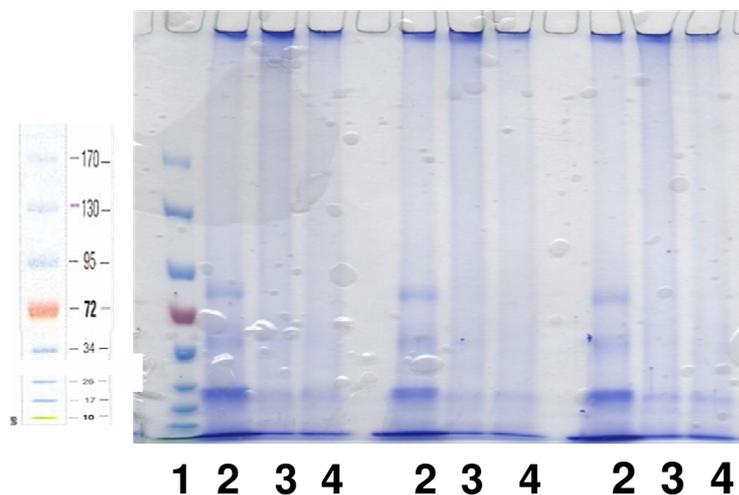


Figura 5 Gel de poliacrilamida (5% T - 20% C) após corrida eletroforética, corado com Coomassie blue

Coluna 1: Padrão de proteínas pré-coradas de 10 a 170 kDa

Coluna 2: Preparação de β -Lg nativa em condições redutoras/aquecimento

Coluna 3: Preparação de β -Lg após exposição à transglutaminase sem cisteína

Coluna 4: Preparação de β -Lg após exposição à transglutaminase com cisteína

4.1.3.4 Controles e antígenos adicionais

Foram testados 56 pacientes. A média dos DPM dos controles positivos (histamina) foi de 6,7 mm (95% IC = 6,3 mm a 7,1 mm).

Dos 56 pacientes testados, 35 (62,5%) apresentaram reações cutâneas ao extrato de leite de vaca (destes 35, a média dos DPM foi de 5,0 mm; IC = 4,6 mm a 5,4 mm). Dos 56 pacientes testados, 20 (35,7%) apresentaram reações cutâneas à alfa-lactoalbumina (destes 20, a média dos DPM foi de 3,9 mm; IC = 3,4 mm a 4,4 mm).

De todos os pacientes testados, 30 (53,6%) apresentaram reações cutâneas à caseína (destes 30, a média dos DPM foi de 3,9 mm; IC = 3,5 mm a 4,2 mm).

Dos 56 pacientes testados, 49 (87,5%) apresentaram reação cutânea a alguma das proteínas bovinas. Dos 56 pacientes, 23 (41,1%) apresentaram reação cutânea ao extrato de soja (destes 23, a média dos DPM foi de 4,6 mm; IC = 4,1 mm a 5,2 mm).

Dos 56 pacientes, 26 (46,4%) apresentaram reação cutânea ao extrato de leite de cabra (destes 26, a média dos DPM foi de 4,7 mm; IC = 4,0 mm a 5,3 mm).

Nenhum paciente reagiu ao controle negativo, nem à solução de transglutaminase ou à solução de cisteína (na tabela 2 na página 60).

4.1.4 SDS-PAGE com beta-lactoglobulina

Os géis de poliacrilamida fixaram bandas nas regiões de 18kDa, 36kDa e 72 kDa nas colunas eletroforéticas das soluções de β -Lg nativa preparada em condições redutoras. As colunas preparadas com β -Lg polimerizada com transglutaminase após tratamento térmico e as colunas preparadas com β -Lg polimerizada pela transglutaminase em presença de cisteína demarcaram bandas em menor intensidade, apenas na região de 18 kDa, pois o tamanho dos polímeros de massa molecular elevada não permite a entrada das moléculas no gel de poliacrilamida nas proporções utilizadas (5%T-20%C). Vide figura 5 na página 64.

Este padrão de corrida corresponde à marcação das bandas dos monômeros de β -Lg (18 kDa), dos dímeros de β -Lg (36 kDa) e tetrâmeros de β -Lg (72 kDa) e é descrito na literatura quando a β -Lg purificada é submetida a arraste eletroforético em gel de gradiente em condições redutoras (o aquecimento a 70°C estimula a polimerização).²¹⁰

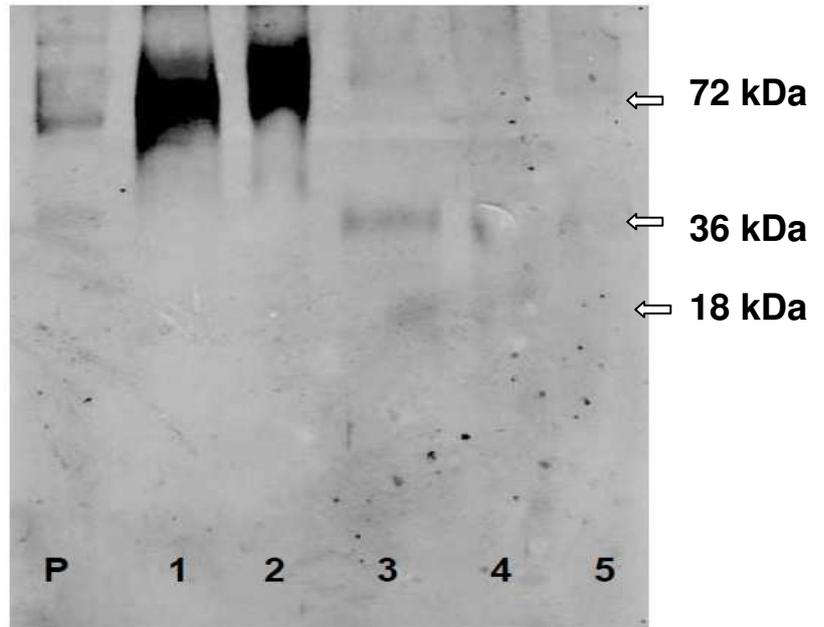


Figura 6 Membrana de nitrocelulose eletrotransferida de um gel de gradiente preparado com P: padrão 10 a 170 kDa; (1) β -Lg aquecida a 90°C por 10 minutos sem mercaptoetanol; (2) β -Lg aquecida a 90°C por 10 minutos com mercaptoetanol; (3) β -Lg não aquecida com mercaptoetanol; (4) β -Lg sem mercaptoetanol não aquecida e (5) BSA 1 mg/mL aquecida com mercaptoetanol. Incubada com o soro de um paciente (MCNM)

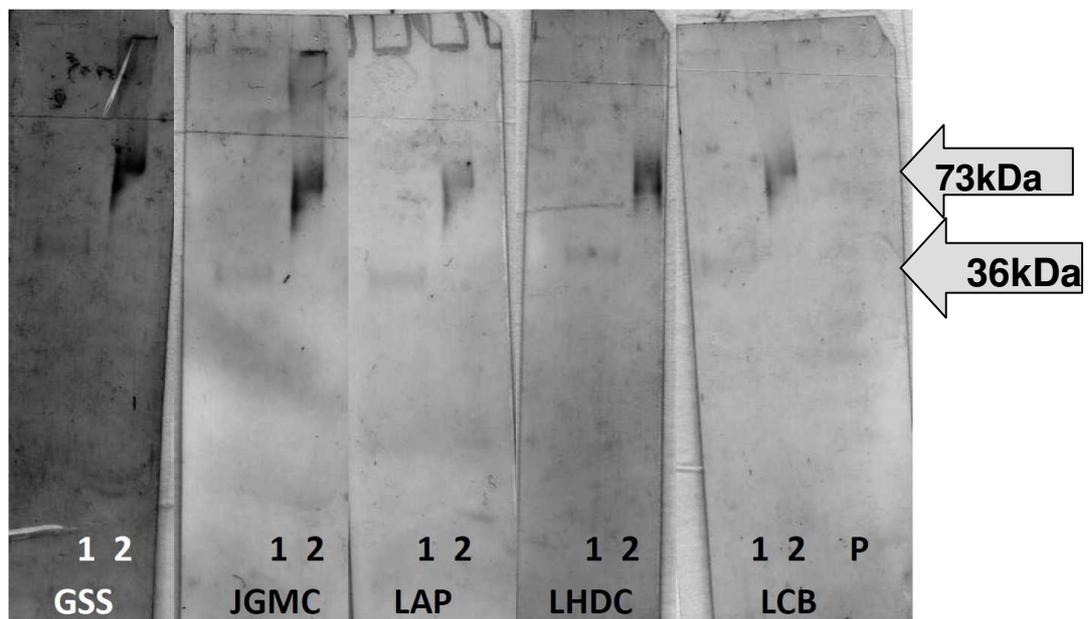


Figura 7 Imunoblote realizado com soro de cinco pacientes com β -Lg preparada em condições redutoras sem aquecimento (coluna 1) e em condições redutoras padrão com aquecimento (coluna 2). P = padrão de proteínas pré-coradas de 10 a 170 kDa.

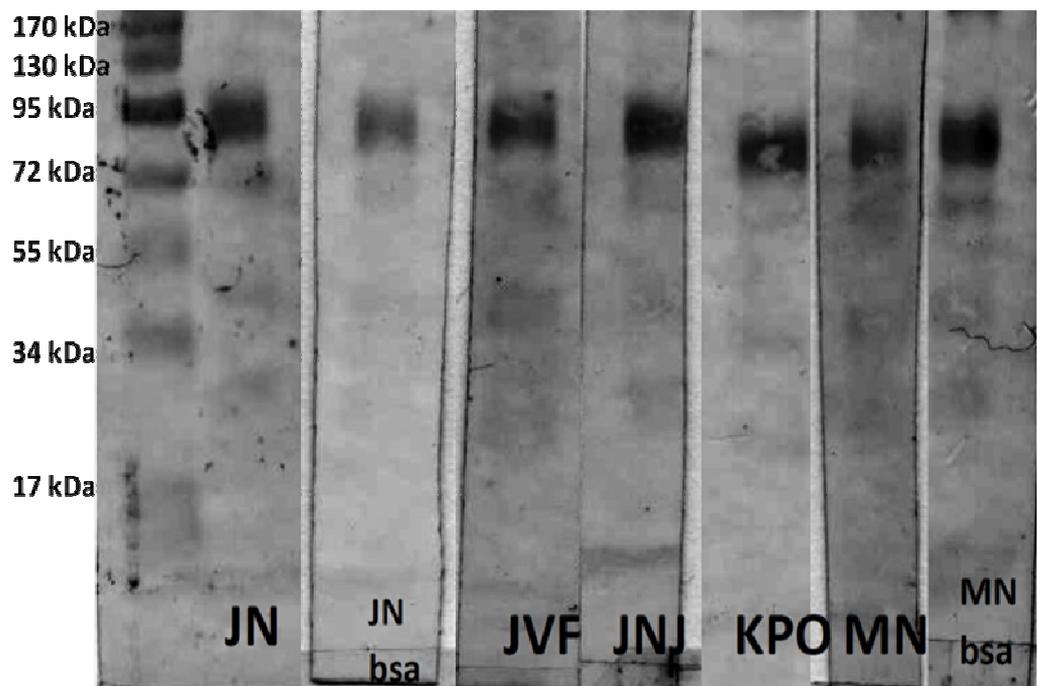


Figura 8 Imunoblote com β -Lg em condições redutoras com aquecimento de amostras de soro de cinco pacientes do grupo A. Duas amostras foram submetidas simultaneamente à competição em fase líquida com BSA 1mg/mL por 30 minutos, antes da incubação com a membrana. (JN bsa e MN bsa).

4.1.5 Imunoblote

4.1.5.1 β -Lg em condições redutoras e não redutoras

Após a transferência das colunas eletroforéticas das proteínas-alvo para a membrana de nitrocelulose, as mesmas foram incubadas individualmente com o soro dos pacientes e reveladas para pesquisa de IgE específica, mostrando os padrões correspondentes às marcações do gel de poliacrilamida corados em *coomassie blue*.

A figura 6 (página 66) é a membrana de nitrocelulose eletrotransferida de um gel de gradiente preparado com β -Lg aquecida a 90°C por 10 minutos sem mercaptoetanol (coluna 1); β -Lg aquecida a 90°C por 10 minutos com mercaptoetanol (coluna 2); β -Lg não aquecida com mercaptoetanol (coluna 3); β -Lg sem mercaptoetanol não aquecida (coluna 4); e BSA 1 mg/mL aquecido com mercaptoetanol (coluna 5) e incubada com o soro de um paciente com presença de IgE específica contra a β -Lg (MCMN).

Para comparar a imunorreatividade à β -Lg preparada em condições redutoras padrão (em tampão contendo 2% SDS e 5% mercapto-etanol) com e sem aquecimento por 10 minutos a 90°C, realizou-se SDS-PAGE com as duas preparações lado a lado em cinco pacientes. O imunoblote demarcou bandas apenas na faixa de 36 kDa na preparação sem aquecimento e demonstrou bandas predominantemente na faixa de 72 kDa nas preparações aquecidas, confirmando a formação de tetrâmeros (polimerização) da β -Lg que ocorre naturalmente a temperaturas maiores de 70°C (vide figura 7 na páginas 66).

4.1.5.2 Desambiguação com a albumina sérica bovina

Uma vez determinada a polimerização (tetramerização) da β -Lg em função do aquecimento, fez-se necessário a distinção entre a imunorreatividade à β -Lg polimerizada (Pol β -Lg) e a imunorreatividade à albumina sérica bovina (BSA), uma proteína do soro do leite de vaca de 66,7 kDa, que poderia teoricamente ser um contaminante da β -Lg purificada (95% de pureza) fornecida pela Davigco. Em função do peso molecular semelhante, a imunorreatividade à BSA poderia ser confundida com a imunorreatividade ao tetrâmero da β -Lg. Amostras pareadas de soro de dois pacientes reativos à β -Lg polimerizada (JN e MN) foram submetidas ao imunoblote. A

uma das amostras de soro realizou-se a competição em fase líquida pela adição de BSA 1mg/mL em agitação por 30 minutos antes da incubação com a membrana de nitrocelulose. A outra amostra foi tratada da maneira habitual. Não houve diferença significativa nos resultados. Vide figura 8 (pg 67).

4.1.5.3 Densidade óptica do Imunoblote com beta-lactoglobulina

Dos 56 pacientes, conseguimos amostras de soro de 53 pacientes em condições de serem submetidas ao imunoblote. Destas 53 amostras, 45 amostras demarcaram bandas (80,3%), sendo que os três pacientes nos quais não foi possível fazer o imunoblote não apresentaram reações cutâneas à β -Lg. E dos 8 pacientes que não demarcaram bandas: um tinha IgE = 1,6 kU/mL e três reagiram no teste cutâneo à β -Lg nativa ou polimerizada com a transglutaminase (tabela 3 na página 61 e figura 9 na página 70).

Dos 45 pacientes que marcaram bandas: 11 pacientes (24,4%) apresentaram leitura na faixa de 18 kDa; a média da densidade óptica corrigida (DOMC) foi de 1,6 (IC = 0,5 a 2,7).

Dos 45 pacientes que marcaram bandas: 19 pacientes (42,2%) apresentaram leitura na faixa de 36 kDa; a média da densidade óptica corrigida (DOMC) foi de 4,0 (IC = 2.4 a 5.6).

Dos 45 pacientes que marcaram bandas: 45 pacientes (100,0%) apresentaram leitura na faixa de 72 kDa; a média da densidade óptica corrigida (DOMC) foi de 17,7 (IC = 14.7 a 20.6).

As diferenças médias entre as densidades ópticas obtidas com o monômero, o dímero e o tetrâmero foram todas significativas entre si ao teste t pareado ($p < 0,05$).

(A distribuição dos valores está representada na figura 10 na página 71).

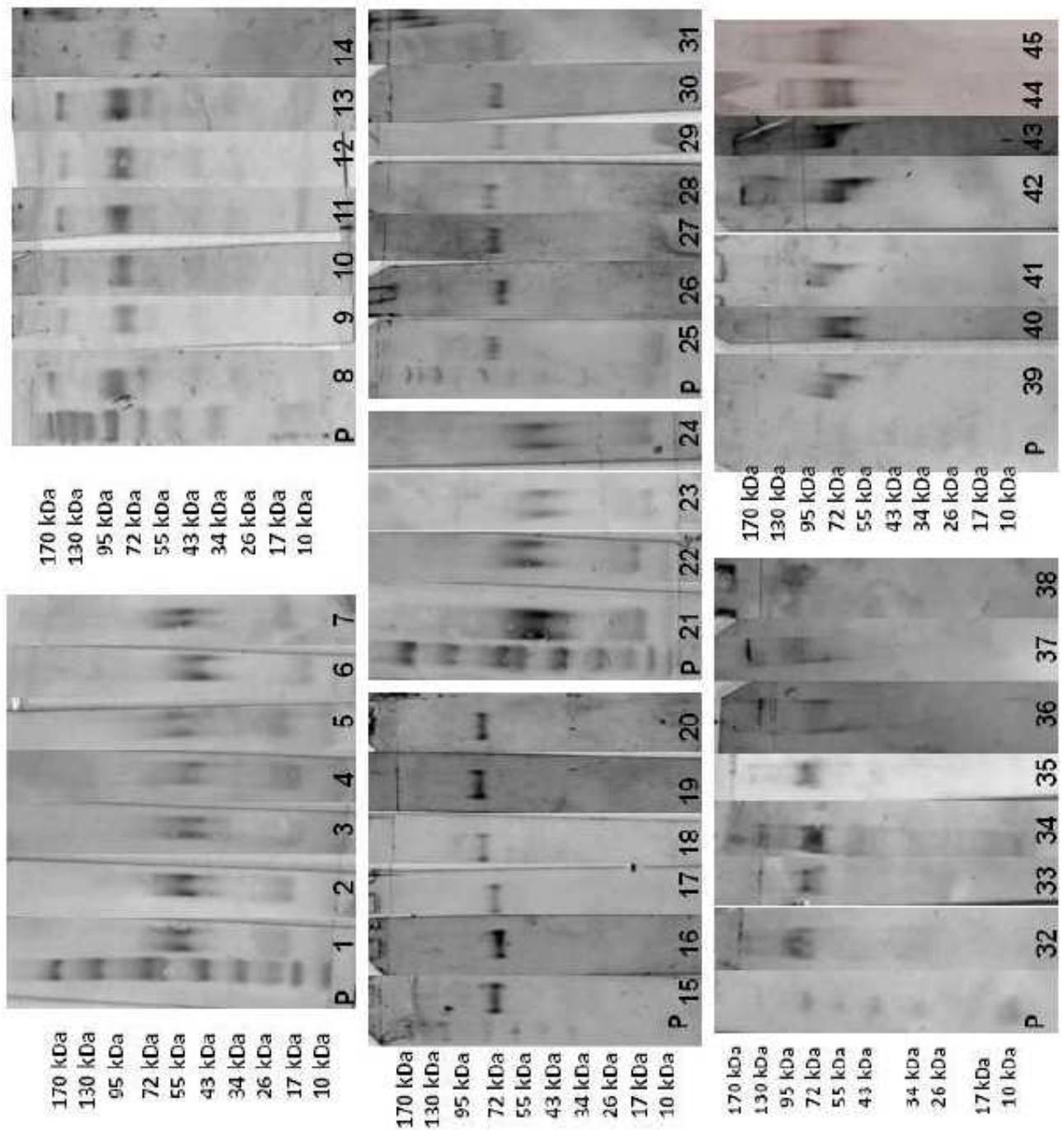


Figura 9 Imunoblot com β -Lg em condições redutoras com aquecimento de amostras de soro dos 45 pacientes reativos do grupo A. P = Padrão de massas moleculares.

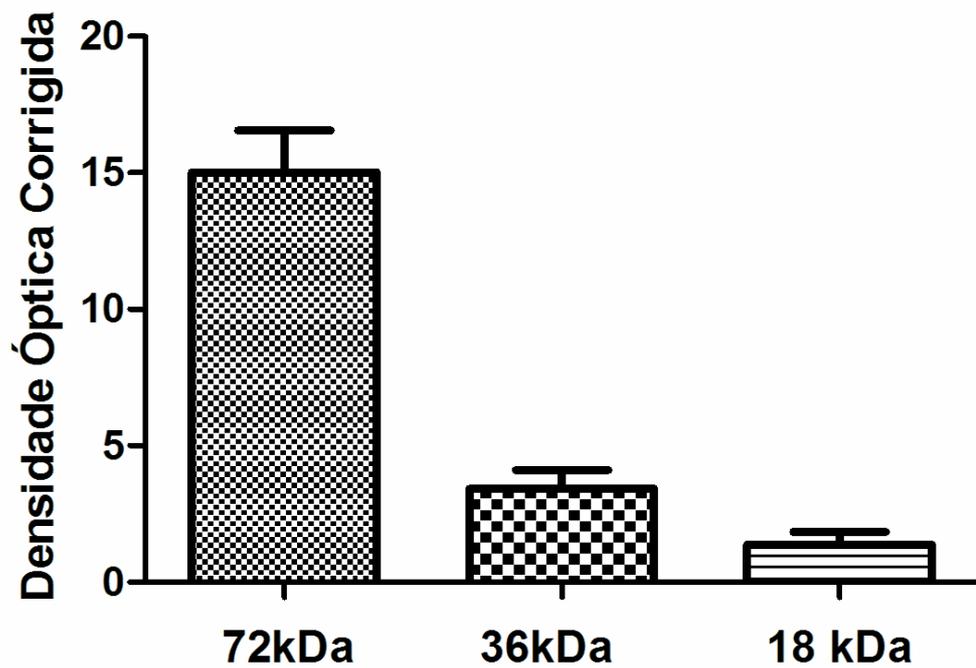


Figura 10 Média das densidades ópticas médias corrigidas obtidas na leitura densitométrica nas bandas distribuídas a 72 kDa, 36 kDa e 18 kDa nos pacientes do grupo A.

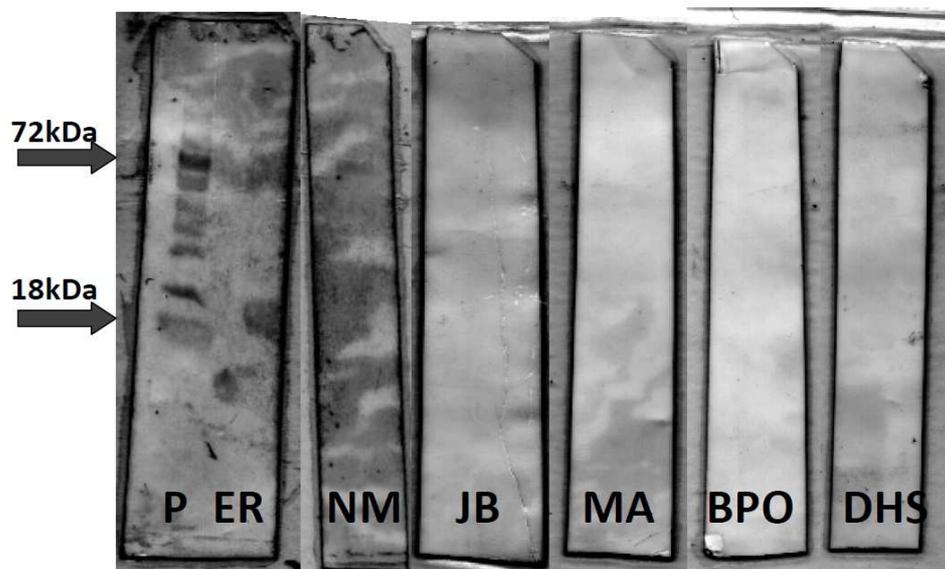


Figura 11 Imunoblote com β -Lg em condições redutoras com aquecimento de amostras de soro de quatro pacientes do grupo B não reativos (JB, MA, BPO, DHS); do único paciente do grupo B reativo (NM) e de um paciente do grupo A reativo, usado como controle do blot (ER). P = padrão de proteínas pré-coradas de 10 a 170 kDa.

4.2 Resultados dos participantes do grupo B

As características clínicas dos participantes do grupo B estão na tabela 4 (página 73). Dos 20 pacientes tolerantes ao leite, com IgE específico para β -Lg indetectável e testes cutâneos não reagentes para β -Lg e TgPol β -Lg, apenas um (5%) apresentou imunoblote positivo para HtPol β -Lg a 72 kDa, com densidade óptica corrigida = 10,5 (figura 11 na página 71).

4.3 Análise caso-controle entre os grupos A e B

Montou-se uma tabela de contingência categórica entre os resultados do imunoblote realizados nos grupos A e B:

	Submetidos ao imunoblote	Positivos
Grupo A	53	45
Grupo B	20	1

As diferenças foram estatisticamente significantes quando submetidas ao teste do Chi-quadrado ($P = 0,0002$) e ao teste de Fisher ($P = 0.0001$).

4.4 Resultados dos participantes do grupo C

As características clínicas e os resultados dos testes cutâneos estão demonstrados na tabela 5 (página 75). O nível médio de anticorpos IgE específicos contra a β -Lg foi de 10,9 kU L⁻¹ (IC = 5,4 a 16,4 kU L⁻¹). Não houve nenhuma reatividade significativa contra a transglutaminase, cisteína ou controle negativo aos testes cutâneos. A média dos DPM para histamina (controle positivo) obtido pelos testes cutâneos foi de 7,7 mm (95% CI = 6,5 a 8,9 mm; DP = 2.67 mm; EP = 0,57 mm), que apresentou uma distribuição normal no teste de normalidade de D'Agostino & Pearson omnibus K^2 (alfa = 0.05; $K^2 = 0.83$; $P = 0.65$). A média dos DPM obtida pelos testes cutâneos para a β -Lg foi 4,2 mm (95% CI = 2,5 a 5,9 mm; DP = 3.8 mm; EP = 0,8 mm), que apresentou uma distribuição normal no teste de normalidade de D'Agostino & Pearson omnibus K^2 (alfa = 0.05; $K^2 = 4.68$; $P = 0.09$).

Tabela 4 Características clínicas dos 20 pacientes tolerantes ao leite de vaca, IgE específica para β -lactoglobulina indetectável ao ImmunoCAP e com testes cutâneos não reagentes às β -lactoglobulinas nativa e polimerizada com transglutaminase (grupo controle B).

Paciente	Idade	Diagnóstico
ACM	18	Dermatite atópica
AVLS	8	Rinite
AES	10	Urticaria
BPO	14	Rinite
BEG	24	Urticaria
CSLL	22	Dermatite atópica
DHS	7	Rinite
GNB	22	Dermatite atópica
GCJ	36	Urticaria
JLM	25	Urticaria
JLPG	8	Rinite
JB	62	Urticaria
LDS	6	Urticaria
MA	4	Dermatite atópica
NGRS	58	Rinite
NM	7	Rinite
PPFC	17	Dermatite atópica
PRM	6	Rinite
RAPGS	37	Rinite
RMF	47	Rinite

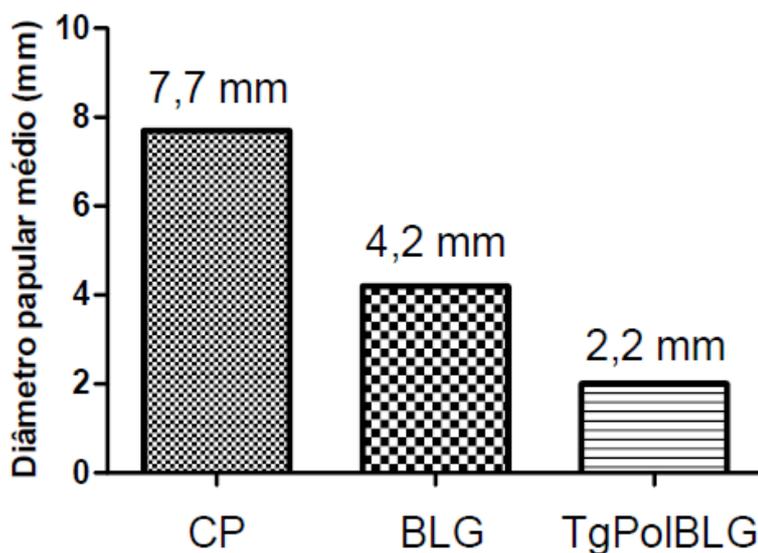


Figura 12 Média dos diâmetros papulares médios obtidos por teste de puntura dos 22 participantes do grupo C. CP: controle positivo (histamina 1mg/mL); BLG: Beta-lactoglobulina nativa (BLG) e TgPol-BLG: Beta-Lactoglobulina polimerizada por transglutaminase em presença de cisteína.

A média dos DPM para TgPol β -Lg obtida pelos testes cutâneos foi 2,0 mm (95% CI = 0.9 a 3.0; DP = 2.4 mm; EP = 0.5 mm), que apresentou uma distribuição normal no teste de normalidade de D'Agostino & Pearson omnibus K^2 (alfa = 0.05; $K^2 = 4.14$; P = 0.12). A média das diferenças no DPM observada entre a β -Lg e TgPol β -Lg no teste cutâneo pareado foi 2,27 mm (P = 0,02; 95% = CI 0,38 a 4,16). Estes dados estão apresentados na figura 12 (pg 73).

Montou-se uma tabela de contingência entre os resultados dos testes cutâneos com a β -Lg a TgPol β -Lg realizados no grupo C, distribuindo apenas a positividade ou negatividade do teste e o número total de participantes.

Tabela de contingência realizada no grupo C

Testes cutâneos com β -Lg	15
Testes cutâneos com TgPol β -Lg	10

As diferenças não foram significantes quando submetidas ao teste do Chi-quadrado (P = 0,64) e ao teste de Fisher (P = 0,46)

4.5 Resultados dos participantes do grupo D (controle)

Não houve nenhuma reatividade cutânea contra a β -Lg; TgPol β -Lg; transglutaminase, cisteína ou controle negativo nos pacientes do grupo controle sem sintomas gastrointestinais, pareado com o grupo C. A média dos DPM para histamina (controle positivo) obtida pelos testes cutâneos foi de 6,3 mm (IC = 5,4 a 7.1; DP = 1,8 mm; EP = 0,4 mm), que demonstrou distribuição normal ao teste de normalidade D'Agostino & Pearson omnibus K^2 (alfa = 0.05; $K^2 = 1.7$; P = 0.4). Os resultados estão apresentados na tabela 6 na página 78.

Pac	Idade	s-IgE	CP	BLG	PoIBL	QC
1	6	12.57	3	8	3	URT
2	7	5.10	4	4	0	URT
3	8	41.92	10	8	0	SIB
4	8	17.89	10	5	3	TGI
5	8	24.32	10	8	4	SIB
6	9	1.88	7	8	0	URT
7	12	1.60	5	3	3	URT
8	12	1.56	6	0	0	AD
9	13	40.77	9	6	0	URT
10	16	16.07	12	15	5	URT
11	21	8.06	6	5	0	AD
12	24	17.79	8	3	5	AO
13	28	5.90	7	0	7	AD
14	28	5.52	9	5	3	URT
15	35	1.20	10	0	0	URT
16	37	1.44	7	5	0	AD
17	39	1.59	7	0	0	AD
18	47	2.04	9	0	0	AD
19	52	3.39	7	5	6	SIB
20	75	4.68	5	0	5	AD
21	94	23.53	5	0	0	SIB
22	95	1.52	14	6	0	SIB

Tabela 5 Características clínicas e resultados dos controles positivos com histamina (CP) dos testes cutâneos em 22 pacientes tolerantes ao leite de vaca com IgE específica para β -lactoglobulina indetectável ao ImmunoCAP, com testes cutâneos não reagentes às β -lactoglobulinas nativa e polimerizada com transglutaminase (grupo controle D). S-IgE: IgE específico contra a β -Lactoglobulina bovina

CP: Diâmetro papular médio do teste cutâneo realizado com histamina (controle positivo)

BLG: Diâmetro papular médio do teste cutâneo realizado com β -lactoglobulina

PoIBL: Diâmetro papular médio do teste cutâneo realizado com β -lactoglobulina polimerizada com transglutaminase

QC: Quadro clínico

URT: Urticária

SIB: Sibilância

TGI: Sintomas gastrointestinais

AD: Dermatite atópica

AO: Alergia oral

4.6 Análise caso-controle entre os grupos C e D

Montou-se uma tabela de contingência entre os resultados dos testes cutâneos com a β -Lg a TgPol β -Lg realizados nos grupos C e D, distribuindo apenas a positividade ou negatividade do teste e o número total de participantes.

Tabela de contingência dos testes cutâneos com β -Lg

	Submetidos ao teste	Positivos
Grupo C	22	15
Grupo D	22	00

As diferenças foram significantes quando submetidas ao teste do Chi-quadrado ($P = 0,0004$) e ao teste de Fisher ($P = 0,0005$).

Tabela de contingência dos testes cutâneos com TgPol β -Lg

	Submetidos ao teste	Positivos
Grupo C	22	10
Grupo D	22	00

As diferenças foram significantes quando submetidas ao teste do Chi-quadrado ($P = 0,0034$) e ao teste de Fisher ($P = 0,0037$).

4.7 Imunorreatividade mediada por células avaliada pelo teste de Inibição da Aderência do Leucócito

No grupo E, a média da taxa de inibição da aderência leucocitária (TIA) após os enfrentamentos antigênicos *ex vivo* provocados com a β -Lg foi de 39% (DP = 36,8% e IC = 29,0% a 50,2%). A média da taxa de inibição da aderência leucocitária (TIA) após os enfrentamentos antigênicos *ex vivo* provocados com a TgPol β -Lg foi de 47,7% (DP = 38,4% e IC = 36,6% a 58,7%). A média das diferenças entre os grupos, avaliada por

teste T pareado não foi significativa ($P = 0,07$). A correlação entre os enfrentamentos com β -Lg e TgPol β -Lg foi significativa (Spearman $r = 0,65$; IC = 0,44 a 0,79 e $p < 0,0001$). Vide tabela 7 na página 79 e figura 13 na página 80.

4.8 SDS-PAGE e Imunoblote com leite desnatado

O gel preparado com o leite de vaca desnatado sem aquecimento demonstrou o padrão habitual de proteínas, com marcação da beta-lactoglobulina na faixa de 36,8 kDa (dímeros) e na faixa de 18,4 kDa (monômeros), além de marcação na faixa das caseínas (19 a 25 kDa), da alfa-lactoalbumina (14,2 kDa) e do BSA (66,5 kDa). Não houve marcação na altura do tetrâmero da beta-lactoglobulina. Vide figura 14 na página 82.

Dentre os 46 pacientes do grupo A submetidos ao imunoblote com o leite de vaca desnatado, a porcentagem de pacientes com IgE-específico detectável para a alfa-lactoalbumina, a beta-lactoglobulina, a caseínas e a albumina sérica bovina foi de respectivamente 21,7%; 63%; 67,3% e 2,1% (vide tabela 8 na página 81 e figura 15 na página 82).

INICIAIS	IDADE	CP	CLINICA
FBNB	6	3	ASSINTOMATICO
LOMM	8	6	ASSINTOMATICO
IDF	8	8	ASSINTOMATICO
BFLF	9	4	ASSINTOMATICO
ESM	11	7	ASSINTOMATICO
RTG	12	5	RINITE
CBT	12	9	RINITE
SGC	13	5	RINITE
CSS	14	3	RINITE
TSC	15	7	RINITE
SMSP	20	5	RINITE
CPA	25	8	RINITE
NSE	25	7	RINITE
HMCS	30	9	RINITE
IVTD	34	5	RINITE
LBB	34	7	RINITE
ESC	38	8	RINITE
NSR	45	5	RINITE
JVSC	55	8	RINITE
TSBG	78	6	RINITE
MT	93	9	RINITE
MCM	93	5	RINITE

Tabela 6 Características clínicas e resultados dos controles positivos com histamina (CP) dos testes cutâneos em 22 pacientes tolerantes ao leite de vaca com IgE específica para β -lactoglobulina indetectável ao ImmunoCAP, com testes cutâneos não reagentes às β -lactoglobulinas nativa e polimerizada com transglutaminase (grupo controle D).

Tabela 7 Resultados por pacientes dos testes de inibição da aderência do leucócito enfrentados com beta-lactoglobulina nativa (BLG) e beta-lactoglobulina polimerizada (BLG-Pol).
 TA = Taxa de Aderência
 TIA = Taxa de Inibição de Aderência
 β Lg = Beta-lactoglobulina nativa
 TgPol β Lg = Beta-lactoglobulina polimerizada

Iniciais	Idade (anos)	TA Controle	TA β Lg	TIA β Lg	TA TgPol β Lg	TIA TgPol β Lg
ACA	21	100	91	9	78	22
AMCM	41	100	36	64	0	100
ACM	18	100	100	0	100	0
APS	13	100	19	81	13	87
ACR	12	100	43	57	0	100
ABP	3	100	38	62	36	64
BSF	6	100	100	0	51	49
CMG	43	100	94	6	92	8
CJ	55	100	90	10	52	48
DHS	7	100	100	0	100	0
DMS	43	100	40	60	19	81
DCBG	40	100	90	10	50	50
EB	33	100	84	16	11	89
EMR	1	100	43	57	37	63
FRLS	33	100	34	66	51	49
GSP	3	100	100	0	84	16
GHF	31	100	35	65	57	43
HML	9	100	13	87	10	90
HN	7	100	100	0	100	0
IAG	66	100	0	100	30	70
IFS	25	100	70	30	50	50
JLS	55	100	100	0	72	28
JCFL	23	100	36	54	0	100
JLM	30	100	100	0	100	0
JFP	64	100	100	0	73	27
KA	29	100	100	0	100	0
KTP	8	100	52	48	44	56
LFO	22	100	100	0	45	55
LF	2	100	56	44	50	50
LWC	7	100	64	36	71	29
LBGS	10	100	17	83	100	0
LAT	50	100	31	69	0	100
MJFC	49	100	100	0	100	0
MCD	50	100	100	0	100	0
MCM	23	100	0	100	0	100
MLF	58	100	100	0	100	0
MAG	33	100	56	44	10	90
MHR	4	100	100	0	35	65
NYM	26	100	0	100	0	100
NS	41	100	17	83	100	0
JLG	8	100	100	0	100	0
RPS	38	100	21	79	32	68
SRN	11	100	17	83	0	100
SNN	54	100	27	73	0	100
VS	53	100	100	0	100	0
VGL	4	100	88	12	90	10
OAC	83	100	5	95	0	100
WAO	45	100	42	58	100	0
WBM	17	100	0	100	21	79

ANTES DA LAVAGEM

APÓS A LAVAGEM

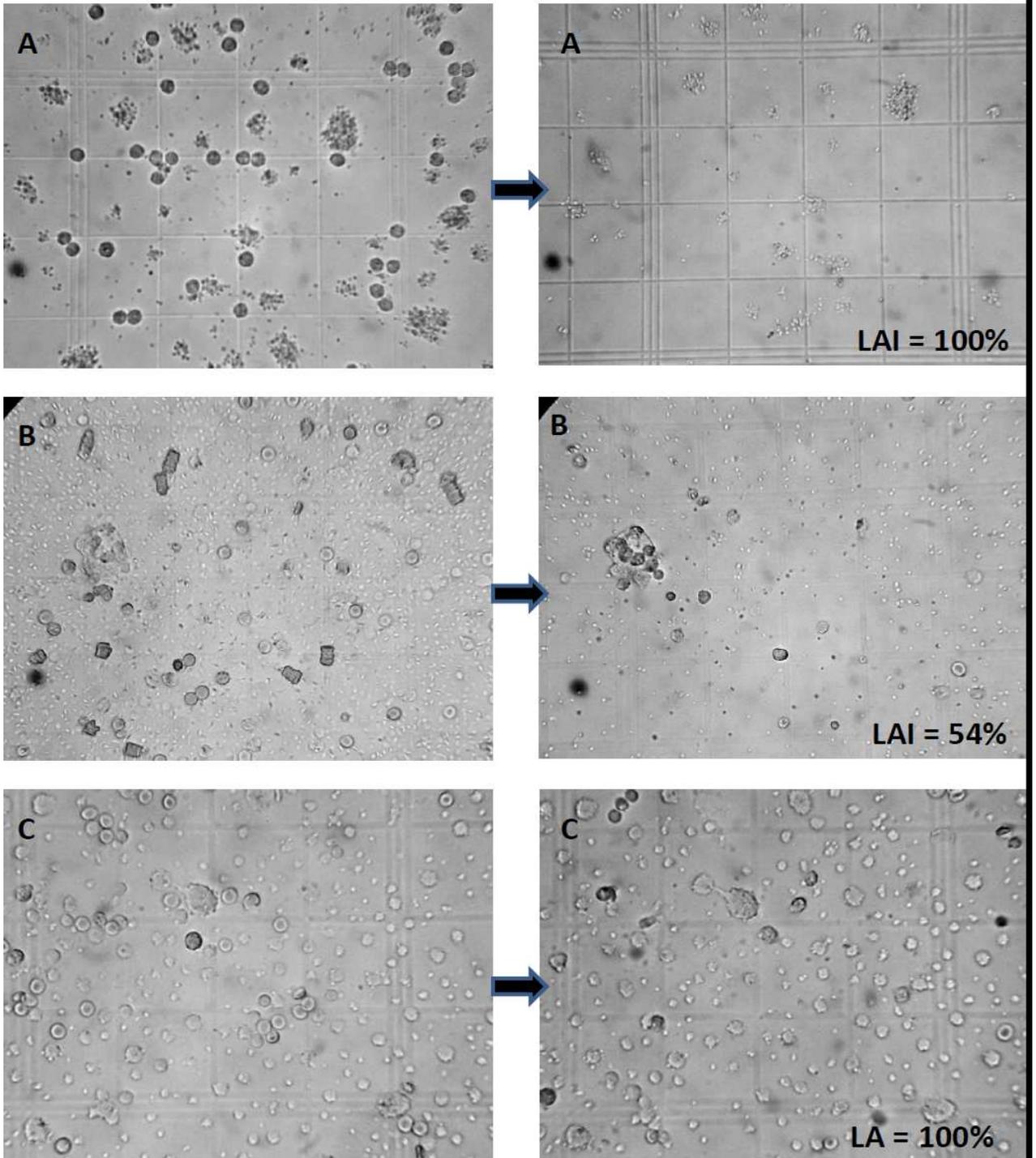


Figura 13 Teste de inibição da aderência leucocitária em dois pacientes do grupo E antes e após a lavagem da câmara em PBS. O paciente A demonstrou taxa de inibição da aderência (LAI) = 100%. O paciente B demonstrou taxa de inibição da aderência 54%. A lâmina C é o controle (sem antígeno) com taxa de aderência = 100%.

Paciente	Idade (anos)	SPT PC	SPT CM	SPT CAS	BLOT 22 kDa	SPT BLG	BLOT 36 kDa	BLOT 18 kDa	SPT ALA	BLOT 14kDa	SPT SOY	SPT GOAT	DELTA H ₂	Sintomas
LAP	28	9	0	0	0.0	0	0.0	0.0	0	0.0	0	0	64	
MTJ	62	4	0	0	0.0	0	0.0	0.0	0	0.0	0	0	132	
VLA	33	4	0	3	11.9	0	0.0	0.0	0	0.0	0	0	43	URT; AR; AST
FSE	18	9	0	0	19.0	0	0.0	0.0	0	0.0	0	0	110	CD
SARR	38	7	0	4	19.7	0	0.0	0.0	0	0.0	0	0	153	URT; AR; AST
HRG	42	9	0	0	0.0	0	0.0	0.0	0	0.0	0	4	114	AR
IEE	65	5	0	0	0.0	0	0.0	0.0	0	0.0	0	4	82	
GRC	46	6	0	0	11.7	0	0.0	0.0	0	0.0	0	5	134	AD; RA
MSN	64	5	0	0	0.0	0	0.0	0.0	0	0.0	0	6	183	
MNP	29	6	0	4	4.5	4	0.0	0.0	4	8.2	4	7	59	CD
MFA	41	7	0	0	24.8	6	5.7	0.0	3	0.0	0	7	18	AR; CD
MLMB	56	8	0	0	0.0	4	13.5	14.7	0	0.0	0	0	167	AR
ISRC	53	6	0	0	12.2	5	19.0	0.0	0	0.0	8	0	84	
GSS	55	5	0	3	17.6	0	19.9	14.6	0	0.0	0	0	96	
VAS	21	7	3	3	18.5	0	20.3	12.5	3	24.6	4	0	181	
SAMC	46	8	4	0	0.0	0	0.0	0.0	0	0.0	0	0	148	URT
JVF	59	6	4	0	0.0	4	0.0	0.0	0	0.0	0	0	120	
CPS	32	7	4	0	0.0	0	0.0	0.0	4	0.0	0	0	33	
KRO	43	6	4	4	14.4	4	6.9	0.0	0	0.0	4	4	125	
GD	53	5	4	3	10.0	0	7.4	0.0	0	0.0	4	4	67	
TCPB	22	9	4	3	12.7	4	11.9	8.7	3	0.0	0	3	142	CD
MCSS	36	8	4	3	12.1	3	13.0	0.0	3	0.0	4	4	84	AR; CD
MAF	51	7	4	3	14.8	3	15.0	0.0	4	6.8	4	4	162	AD; RA; AST CD
MCCS	42	9	4	3	17.5	9	22.6	0.0	6	14.7	0	0	150	
DH	34	6	4	3	45.7	3	25.7	0.0	3	12.3	4	5	203	
PRBF	50	10	4	0	0.0	6	35.3	0.0	0	0.0	0	0	31	
WBA	41	4	5	5	0.0	0	0.0	0.0	0	0.0	0	4	136	
CADS	42	6	5	0	0.0	4	0.0	24.3	4	5.0	4	0	54	
MCNM	52	8	5	4	0.0	5	0.0	0.0	0	0.0	4	3	86	CD
RSL	23	6	5	4	21.1	5	6.3	0.0	0	0.0	6	10	192	
JGMC	48	5	5	0	15.2	3	11.4	0.0	0	0.0	4	4	148	
SAP	57	7	5	3	35.5	6	15.2	13.1	3	18.1	4	5	163	AR
MGGG	56	7	5	4	23.5	6	16.6	0.0	3	13.0	5	6	29	AD; AR; CD
STMC	40	7	5	0	0.0	0	19.2	0.0	0	0.0	0	0	134	AR
JNJ	58	6	5	4	30.9	0	29.1	0.0	0	0.0	0	0	162	AR; CD
FAL	26	11	5	3	33.3	0	31.4	0.0	5	0.0	4	5	77	AD; AST; CD
CF	48	8	5	0	14.2	4	65.6	0.0	0	0.0	0	0	74	AR; AST
APSL	54	7	5	0	72.2	4	74.4	39.3	0	0.0	4	3	74	CD
AG	46	5	5	5	116.3	5	91.0	60.5	0	0.0	7	3	164	AR; CD
LCB	39	6	6	4	13.4	3	10.1	0.0	4	0.0	5	5	160	CD
MROF	70	7	6	4	31.2	4	34.0	0.0	4	0.0	7	6	88	AR; CD
BLOG	51	8	6	5	38.3	5	39.3	0.0	4	7.2	5	4	57	AR; AST
APSL	45	7	6	5	19.9	4	58.7	0.0	0	0.0	3	3	100	
MLJA	58	4	7	3	19.0	0	0.0	0.0	0	0.0	0	0	181	
ERS	47	6	8	4	36.7	0	0.0	0.0	7	22.9	6	0	124	AR; CD
RCN	63	8	9	0	0.0	6	38.0	9.6	0	0.0	3	0	180	AR; AST

Tabela 8. Características clínicas e resultados analíticos dos pacientes do grupo A submetidos ao imunoblote realizado com leite de vaca desnatado.

SPT: skin prick test (mm); PC: controle positivo (histamina); CM: leite de vaca desnatado; CAS: caseína; BLOT 22 kDa: densidade óptica ajustada da banda marcada no imunoblote entre 19 e 25 kDa (caseínas α S1, α S2, β and κ); BLG: beta-lactoglobulina; BLOT 36 kDa: densidade óptica ajustada da banda marcada no imunoblote em 36 kDa (dímeros da beta-lactoglobulina); BLOT 18 kDa: densidade óptica ajustada da banda marcada no imunoblote em 18 kDa (monômeros da beta-lactoglobulina); ALA: alfa-lactoalbumina; BLOT 14 kDa: Densidade óptica ajustada da banda marcada no imunoblote em 14 kDa (alfa-lactoalbumina); SOY: extrato de proteínas de soja; GOAT: leite de cabra desnatado; Delta H₂: maior diferença de excreção de hidrogênio (ppm) após provocação com lactose; AR: rinite alérgica; AD: dermatite atópica; AST: asma; URT: urticária; CD: diarreia provocada pela ingestão de queijo maturado com baixo teor de lactose.

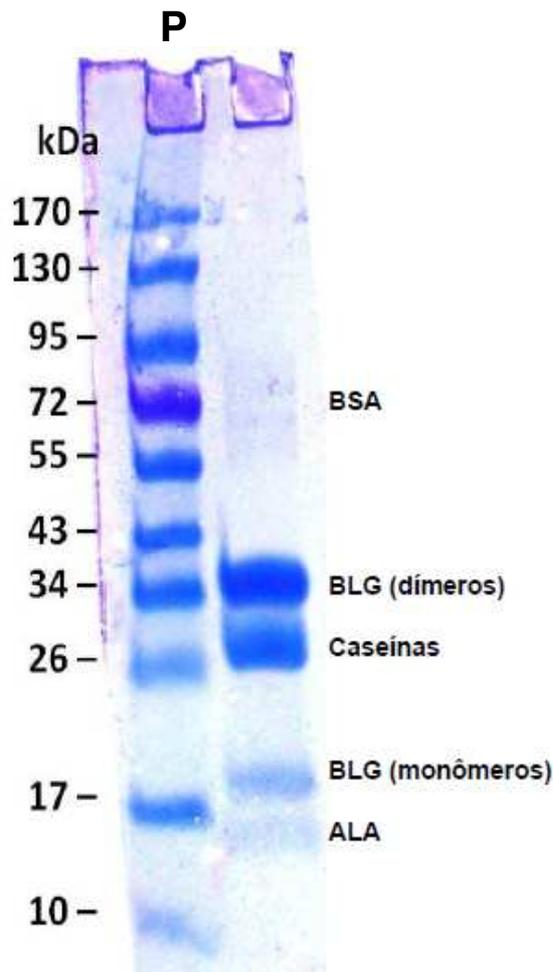


Figura 14 Gel de poliacrilamida após eletroforese com leite de vaca desnatado (SDS-PAGE com mercaptoetanol não aquecido), corado com coomassie blue. BSA: Albumina sérica bovina; BLG: beta-lactoglobulina; ALA: alfa-lactalbumina. P = Padrão de proteínas pré-coradas de 10 a 170 kDa.

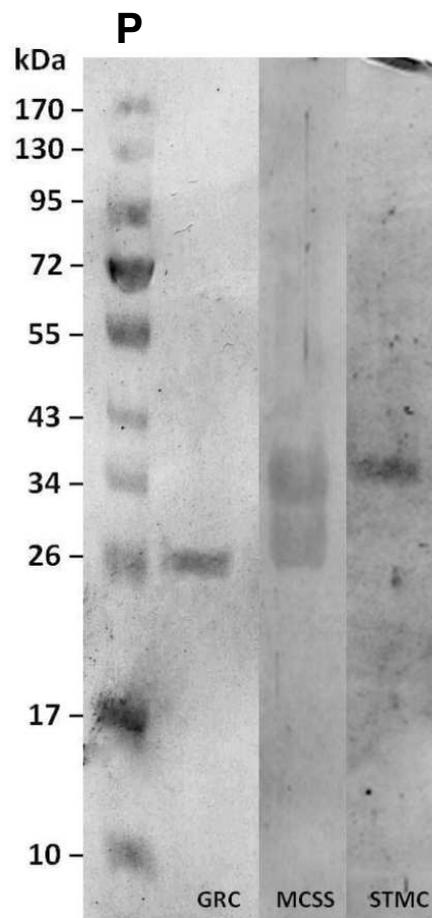


Figura 15 Imagem de membranas de nitrocelulose (0,45 μm) após transferência de gel de SDS-PAGE com leite desnatado e incubação com soro de três pacientes (GRC, MCSS e STMC), anticorpo primário IgG caprino anti-IgE humano, anticorpo secundário de coelho anti-IgG caprino conjugado com peroxidase do rábano, seguido de revelação com DAB. Os imunoblots mostram três diferentes padrões de sensibilização: sensibilização somente para caseínas (19 a 25 kDa); sensibilização somente para o dímero da beta-lactoglobulina (36kDa) e sensibilização a ambas proteínas. P = padrão de proteínas pré-coradas de 10 a 170 kDa.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A principal estratégia clínica para a condução de pacientes com alergia ao leite de vaca é a confecção do diagnóstico das proteínas ofensoras (proteínas do soro, das caseínas do queijo, ou ambas) para a prescrição de uma dieta de exclusão adequada.^{164,252-253}

Apesar disso, as estratégias de exclusão também podem contribuir para a perda de tolerância.²⁵⁴ Alguns protocolos de indução de tolerância oral utilizando leite de vaca integral já têm sido descritos.¹⁶²⁻¹⁶³ Entretanto, o uso do extrato natural de um alérgeno pode desencadear reações clínicas, limitando o progresso da dessensibilização.¹⁶⁵ Alérgenos modificados (alergóides) têm sido utilizados em protocolos de dessensibilização para minimizar as reações produzidas pelos alérgenos naturais.¹⁶⁷ Proteínas imuno-equivalentes, porém menos alergênicas, podem também ser obtidas, por exemplo, utilizando tecnologia de recombinação gênica, mas este é um método caro e trabalhoso.¹⁶⁸ Abordagens mais acessíveis, incluindo cozimento extensivo têm sido utilizados para a indução de tolerância ao leite, na assunção de que a destruição dos epítomos conformacionais podem gerar uma proteína mais segura para a administração.¹⁶⁹ Entretanto, este tipo de desnaturação física pode induzir modificações de difícil controle no alérgeno, tornando a caracterização do alérgeno resultante uma tarefa quase impossível, e na destruição dos epítomos lineares necessários para a indução da tolerância.¹⁷⁰⁻¹⁷² A estratégia racional para a realização de uma indução de tolerância idealmente inclui o uso de uma proteína imunogênica (possuindo o maioria dos epítomos lineares de linfócitos T), mas pouco alergênica (menos capaz de induzir reações clínicas).¹⁵⁷ A alergenicidade de um antígeno modificado pode ser avaliada em provas de enfrentamento *in vivo* (cutâneas ou orais)¹⁴⁶⁻¹⁴⁷ ou provas de enfrentamento *ex vivo*, como a prova de degranulação de basófilos.⁶¹ A avaliação da extensão da imunorreatividade celular eliciada pelo antígeno responsável pelo “priming” da resposta subsequente (imunogênica ou tolerogênica) pode ser realizada antes do tratamento através de ensaios de proliferação de linfócitos T²¹⁴ ou após o tratamento pela pesquisa de marcadores de imunotolerância de culturas de PBMCs ou pesquisa de iT_{reg} que expresse IL-10 e TGF-β.²¹⁵ Como um modelo para este estudo, empregamos a

polimerização enzimática, um processo utilizado para a produção de alimentos industrializados. O uso da biotecnologia para modificar as propriedades físicas dos laticínios é prática corrente e pode resultar na criação de produtos menos alergênicos, ou novos alérgenos mais ou menos problemáticos.²⁵⁵

Neste trabalho vivemos duas situações clínicas bem diferentes. A primeira situação clínica foi a do especialista em gastroenterologia, que é procurado por pacientes com sintomas gastrointestinais, e que se especializa em identificar doenças funcionais como a intolerância à lactose. A segunda situação clínica foi a do especialista em pediatria, que está habituado com o diagnóstico de alergia ao leite de vaca e que atende uma população que geralmente só apresenta intolerância à lactose de maneira secundária a distúrbios gastrointestinais pré-estabelecidos.

Em adultos, a reação adversa mais comum ao leite de vaca é a intolerância à lactose devido à deficiência de lactase. A lactose é um dissacarídeo (galactose β -1,4 glicose) que não é absorvido pelo epitélio intestinal, e por isso deve ser hidrolisado em galactose e glicose pela lactase/phlorizin hidrolase das vilosidades do intestino delgado humano, para ser absorvida.¹¹¹ A habilidade de produzir a lactase é geneticamente perdida pela maioria dos seres humanos após a infância (hipolactasia de início tardio).¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Os sintomas da deficiência de lactose incluem dor abdominal, distensão abdominal, flatulência e diarreia aquosa e são diretamente dependentes da dose de lactose ingerida com os alimentos.¹¹³ Estes sintomas também podem ser provocados pela hipersensibilidade gastrointestinal imediata às proteínas do leite de vaca, uma condição de hipersensibilidade imune mediada por IgE.⁷⁶ Uma vez que a hipolactasia adquirida de início tardio é uma condição altamente prevalente, é razoável deduzir que os pacientes adultos com hipersensibilidade IgE-mediada ao leite de vaca têm grande chance de apresentar como comorbidade a intolerância à lactose.

Os pacientes adultos encaminhados pelo setor de gastroenterologia do hospital de referência não eram pacientes representantes da população geral. Todos eles já haviam previamente procurado diversos outros serviços médicos e, não encontrando uma solução satisfatória para seus problemas, acabaram por ser referenciados para o setor terciário de atendimento. Eram pacientes triados e que como denominador comum ressaltavam a refratariedade ao tratamento com a dieta de exclusão da lactose. Foram

nestes pacientes que realizamos a investigação mais detalhada com testes cutâneo-alérgicos, dosagem de IgE específica contra a β -Lg e o imunoblote. Os resultados foram de certo modo surpreendentes. De um total de 56 pacientes estudados, apenas 4 pacientes (7,1%) não mostraram nenhuma evidência de sensibilização imunológica. Pediatras estão acostumados a fazer o diagnóstico de hipersensibilidade de natureza imunológica ao leite de vaca em lactentes, mas este diagnóstico em tantos pacientes adultos é inusitado. É claro que o diagnóstico de hipersensibilidade não corresponde necessariamente a um diagnóstico de doença alérgica. Mas a linha de distinção entre estas duas condições nem sempre é clara e depende do julgamento e da experiência do médico assistente, muitas vezes auxiliado por testes como a dieta de exclusão e a prova de provocação oral. Como a doença alérgica é um processo dinâmico e cursa com fases de surtos e remissões, mesmo estas provas nem sempre são definitivas. Como nossa proposta inicial era estudar a imunorreatividade comparativa e não estabelecer o diagnóstico clínico de doença alérgica, não incluímos as provas de provocação oral com as proteínas isoladas no projeto do experimento. Por outro lado o estabelecimento do grupo controle assintomático deixou evidentes as diferenças na sensibilização de natureza imunológica, uma vez que dos 20 sujeitos do grupo controle, apenas 1 (5%) apresentou evidência de anticorpos IgE específicos contra a β -Lg no imunoblote, sendo que os testes cutâneos e a pesquisa por ImmunoCAP foram todos não reagentes. Esta observação nos ajuda a estabelecer uma ligação entre as características clínicas e a sensibilização imunológica.

Dentre as proteínas imunorreativas encontradas no leite de vaca, a β -Lg é proeminente, em função de sua alta concentração (3 – 4 g/L) e baixa digestibilidade.¹⁸⁶ Uma vez que a β -Lg não é um componente natural do leite humano,¹⁷⁸ e geralmente é absorvida de forma inalterada,¹⁹¹ é compreensível a existência de altas taxas de sensibilização a esta proteína.¹⁴⁷

A β -Lg ocorre naturalmente em dímeros em pH > 3.²⁶⁴ O aquecimento a 70 °C induz uma polimerização adicional, formando tetrâmeros.²⁶⁵ A β -Lg purificada geralmente apresenta monômeros, dímeros e tetrâmeros quando analisada em SDS-PAGE.²¹⁰ A polimerização de proteínas com a transglutaminase utilizada na indústria alimentícia é uma técnica utilizada para diminuir a sinérese e aumentar a viscosidade e

a consistência dos queijos de coalho e iogurtes.²⁶⁶ Já se demonstrou que o tratamento com a TG reduz a alergenicidade do trigo.²⁶⁷ Uma vez que existem também evidências que a polimerização pela transglutaminase reduz a alergenicidade da β -Lg²¹¹ e da ovalbumina²¹³ em camundongos, a aplicação de técnicas de polimerização poderia potencialmente reduzir a alergenicidade de alimentos processados assim como ser útil na produção de “alergóides” para a dessensibilização imune ou indução de imunotolerância.¹⁸⁷ Uma possível explicação esta redução na alergenicidade seria o mascaramento dos epítomos devido à ligação cruzada entre as proteínas. A polimerização seria também capaz de criar novos epítomos que resultariam no desenvolvimento de sensibilidades não relacionadas com a proteína original.

O objetivo principal deste trabalho foi o de comparar a imunorreatividade (*in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*) da β -Lg polimerizada com a da β -Lg nativa ou natural. Estudamos este paradigma em duas condições. A primeira foi o emprego da β -Lg polimerizada pela transglutaminase em presença de cisteína (TgPol β -Lg). A TgPol β -Lg foi utilizada nos testes cutâneo-alérgicos realizados de maneira pareada com a β -Lg nativa e nos testes de enfrentamento *ex vivo* monitorados pelo teste de inibição da aderência do leucócito. Como a polimerização pela transglutaminase resulta em polímeros de massa molecular elevada que não penetram nos géis de SDS-PAGE, para a confecção dos imunoblotes a β -Lg foi polimerizada através do aquecimento, que gera tetrâmeros, considerados polímeros para fins analíticos.²¹⁰ A literatura que expõem os experimentos realizados com imunoblotes de β -Lg não é padronizada neste ponto. Alguns aquecem a β -Lg (ou leite total)²⁵⁶ para o SDS-PAGE e outros não,²⁵⁷ resultando em padrões diferentes de distribuição de massas moleculares. Outros autores já chegaram a interpretar o tetrâmero de β -Lg como se fosse BSA em colunas eletroblotadas com β -Lg purificada após ser submetida a aquecimento. Um dos trabalhos chegou a atribuir a pouca detecção do monômero da β -Lg à “desnaturação” provocada pelos 10 minutos de fervura. Na verdade a β -Lg não se desnatura com a fervura, mas polimeriza-se, marcando assim bandas na altura de 73 kDa que pode ser confundido com a BSA, mas os autores não consideraram este fenômeno na discussão do artigo.²⁵⁶ Justamente por isso, um dos cuidados que tivemos ao realizar o imunoblote foi a desambiguação do tetrâmero da β -Lg (73 kDa) com a albumina sérica bovina (BSA - 67 kDa).

Os testes cutâneos prestaram-se para avaliar a imunorreatividade *in vivo* contra um neo-antígeno resultante da produção industrial de laticínios, e os imunoblotes serviram para a detecção de anticorpos IgE específicos contra uma proteína alimentar encontrada em monômeros em pH ácido, em dímeros em pH fisiológico e em tetrâmeros após aquecimento. Os imunoblotes serviram tanto para o diagnóstico da sensibilização do indivíduo, quanto para avaliação de sensibilidade analítica da metodologia empregada (SDS-PAGE com e sem tetrâmeros de β -Lg).

Os resultados dos testes cutâneos apresentados neste estudo identificaram redução significativa na alergenicidade da TgPol β -Lg em relação à β -Lg. A polimerização altera a distribuição espacial dos epítomos, o que pode explicar a diminuição da reatividade cutânea à proteína. Entretanto, apesar da reatividade cutânea média da TgPol β -Lg ser menor que a da β -Lg, quatro pacientes não demonstraram reação cutânea à β -Lg e apresentaram reatividade cutânea à TgPol β -Lg. Este achado sugere que a polimerização pode ser deletéria para alguns pacientes. A polimerização também aumentou a detecção analítica do IgE específico para a β -Lg pelo SDS-PAGE. Antes de ser submetida à eletroforese a β -Lg foi aquecida por 10 minutos a 96°C. O aquecimento estimula a polimerização da β -Lg e resulta na detecção de bandas a 73 kDa (tetrâmeros).²¹⁰ Uma vez que os monômeros são proteínas muito pequenas, eles podem ser perdidos durante o processo do blot devido à difusão através dos poros da membrana de nitrocelulose. Observamos isto algumas vezes quando colocamos duas membranas no conjunto da eletrotransferência e observamos que a segunda membrana também foi marcada pelas proteínas de baixa massa molecular (ou seja, atravessaram a primeira membrana). Sendo que a polimerização aumenta a massa molecular da proteína, há maior retenção na membrana durante a eletrotransferência e melhor demarcação pelos anticorpos específicos. Este efeito foi demonstrado pelo significativo aumento na densidade óptica corrigida das bandas de 73 kDa em relação às bandas de 36 e 18 kDa.

Observamos então que a polimerização resultou em diminuição da imunorreatividade cutânea e aumento da imunorreatividade analítica. Apesar de serem resultados aparentemente contraditórios, na verdade são conclusões independentes e complementares. A imunorreatividade cutânea depende essencialmente da

aproximação espacial de anticorpos da classe IgE ligados por sua fração Fc aos receptores de alta afinidade presente nos mastócitos cutâneos (FcεRI). Isto significa que para estimular a degranulação do mastócito, faz-se necessário que duas ou mais moléculas de IgE ligadas ao mastócito liguem-se simultaneamente a uma mesma molécula de β-Lg. A ligação simultânea estimula a aproximação das porções intracitoplasmáticas dos receptores de alta afinidade permitindo a cascata de fosforilação de proteínas específicas que geram o sinal para a degranulação.²⁵⁸ Esta particularidade faz com que as alterações geométrico-espaciais do alérgeno original (como as induzidas pela polimerização covalente) interfiram no processo de ligação cruzada, possivelmente por dificultar a aproximação dos receptores de alta afinidade e a subsequente degranulação dos mastócitos.²⁵⁹

A polimerização por aquecimento, por outro lado, realizada durante o preparo da solução de β-Lg para a corrida eletroforética, produz tetrâmeros²¹⁰ que se ligam aos anticorpos IgE específicos e facilitam a visibilidade da banda no imunoblote em relação à visibilidade do monômero e do dímero, aumentando assim a sensibilidade analítica do método.

Justamente por não destruir os epítomos e por diminuir a imunorreatividade ao nível das células efectoras (mastócitos e basófilos) a β-Lg polimerizada converte-se em uma molécula promissora para compor um protocolo de dessensibilização clínica de pacientes hipersensíveis à β-Lg natural. Mais estudos seriam necessários, para determinar qual o grau de polimerização seria ideal (tetrâmeros ou a polimerização enzimática) no sentido de conservar os epítomos e diminuir a imunorreatividade clínica da molécula.

Uma das considerações desta pesquisa que consideramos relevante é a desmistificação dos exames complementares. Muitos alergistas e mesmo a literatura de revisão cultivam o conceito de que o teste cutâneo não reagente para o alimento suspeito (ou a pesquisa de IgE específica negativa) afastaria por definitivo o diagnóstico de hipersensibilidade de natureza alérgica,²⁶⁰ mas quando reunimos todos os dados clínicos e laboratoriais, concluímos que nenhum exame complementar foi definitivo para descartar o diagnóstico de sensibilização. Falsos negativos aconteceram com todos os testes, inclusive com o imunoblote, que tem sensibilidade de picogramas. Há que se

valorizar a clínica e a anamnese bem feita. Para fazer uma estimativa da sensibilidade analítica do ImmunoCAP e dos testes cutâneos (tomando o imunoblote como referência) analisamos a acurácia destes dois testes apenas nos pacientes com imunoblote positivo. Neste grupo de 45 pacientes a sensibilidade analítica do ImmunoCAP foi de 42,2%. A sensibilidade analítica do teste cutâneo de puntura realizado com a β -Lg nativa foi de 56,5%. A sensibilidade analítica combinada do ImmunoCAP e do teste cutâneo de puntura realizado com a β -Lg nativa foi de 77,5%. Quando combinamos a estes dois testes os resultados do teste cutâneo de puntura realizado com a β -Lg polimerizada, a sensibilidade analítica combinada aumenta para 84,4%. O ImmunoCAP demonstrou então uma taxa de falsos negativos de 57,8%. Os testes cutâneos demonstraram uma taxa de falsos negativos de 42,3%. Quando os testes são associados a taxa de falso-negativos cai para 24,5%. Estes dados demonstram que os dois testes analíticos são ferramentas complementares para o diagnóstico de sensibilização e que o resultado negativo em um ensaio não indica necessariamente ausência de sensibilização.

A eletroforese de gradiente do leite de vaca apresenta quatro alérgenos principais. As caseínas (Bos d 8) constitui-se em uma família de fosfoproteínas hidrofóbicas relacionadas (α S1, α S2, β e κ) com um grande número de peptídeos de prolina (19 - 25 kDa). A α -lactoalbumina (Bos d 4) é uma proteína do soro com 14,2 kDa. A albumina sérica bovina (Bos d 6) é um componente sérico de 66,6 kDa secretado no leite. A β -lactoglobulina (Bos d 5) é uma proteína do soro de 18,4 kDa encontrada em dímeros (36,8 kDa) em pH neutro e como monômeros em pH menor do que 3.¹²³ Uma vez que realizamos a eletroforese em tampão de corrida com pH 8,3, observamos uma maior proporção de dímeros da β -lactoglobulina do que de monômeros.

O diagnóstico de sensibilização às proteínas do leite de vaca mediada por IgE é útil na prescrição de medidas dietéticas, principalmente quando definimos as proteínas envolvidas. O leite de vaca tem duas fases. As caseínas compõem a fase sólida (queijo). A fase líquida (soro) retêm a lactose e dezenas de proteínas como a β -lactoglobulina, a α -lactoalbumina, a albumina sérica bovina, as imunoglobulinas e outras. Laticínios industrializados provêm uma fonte adicional de sensibilização devido

à modificação das proteínas nativas.^{133, 173} Ao estabelecer diretrizes dietéticas para um paciente com hipersensibilidade ao leite de vaca é essencial conhecer todos os componentes aos quais ele é sensibilizado. Ao realizar um diagnóstico de “intolerância à lactose” baseado somente em estatísticas, assume-se o risco de negligenciar o diagnóstico de comorbidades importantes como as alergias às caseínas e às proteínas do soro. A dieta de exclusão é diferente para cada condição. De fato, não é raro encontrar na prática clínica pacientes com alergia às proteínas do leite de vaca fazendo uso de fórmulas isentas de lactose, na ilusão de que não são nocivas. O nível de lactose é reduzido no queijo pela extração do soro e pela fermentação bacteriana.²⁶² Um paciente com intolerância à lactose ou alergia às proteínas do soro do leite será capaz de ingerir queijo maturado livre de lactose, se não co-existir alergia às caseínas. Um paciente com alergia à caseína deve evitar todos os derivados do leite e às vezes até a ingestão de soja, uma vez que a fração S30 da proteína da soja pode apresentar reações cruzadas com as caseínas do leite.²⁶³ Este fato explica a frequência significativamente aumentada de reatividade cutânea à soja entre os pacientes com reatividade cutânea à caseína. Algumas vezes, uma simples anamnese é suficiente para distinguir entre estas duas condições, mas testes cutâneos e imunoenaios geralmente são necessários e muito úteis para confirmar a suspeita de sensibilização primária ou co-existente. Todos os pacientes do grupo intolerante que apresentaram sintomas após a ingestão de queijo maturado mostraram sensibilidade mediada por IgE verificada por imunoblote ou testes cutâneos. A co-existência de sensibilização ao leite em pacientes com intolerância à lactose não é uma indicação *per se* de alergia ao leite de vaca, mas alguns pacientes com intolerância à lactose que não respondem bem à dieta de exclusão de lactose podem ser alérgicos às proteínas do leite de vaca, principalmente pacientes com manifestações extra-intestinais. Para confirmar é necessária uma prova de provocação com uma fórmula de leite de vaca isenta de lactose. Concluímos que a sensibilização mediada por IgE às proteínas do leite de vaca é uma comorbidade freqüente entre indivíduos com intolerância à lactose refratários à dieta livre de lactose. A investigação de sensibilização imune às proteínas do leite de vaca pode conduzir a diagnósticos mais acurados e decisões terapêuticas mais consistentes.

A inibição da habilidade dos leucócitos de aderir ao vidro após um enfrentamento *ex vivo* depende principalmente de mecanismos celulares que resultam na interação de linfócitos T, B e macrófagos.²³⁹⁻²⁴² Quando ativados na presença do antígeno específico, células formadoras de rosetas de eritrócitos de carneiro (linfócitos T) liberam fatores solúveis sobrenadantes que interferem no fenômeno da aderência ao vidro que é observado no plasma controle não enfrentado.²¹⁸ O envolvimento dos linfócitos T também foi sugerido pelo fato que anticorpos murinos anti-theta também abolem a inibição da aderência.²⁴³⁻²⁴⁴ Leucotrienos, e em especial LTC₄ são fatores participantes e modulados por interferon.²⁴⁶⁻²⁴⁷ Como a geração de cisteinil leucotrienos pelas células dendríticas é um passo demonstrado no reconhecimento de alérgenos dectin-2 dependentes, o teste de inibição da aderência leucocitária pode estar avaliando esta via indiretamente.²⁶⁸ A avaliação da imunorreatividade celular poderia sugerir a capacidade de um alérgoide de induzir imunotolerância, e isto ainda é um objeto de estudo. O mecanismo de desenvolvimento de tolerância induzida inicia-se com as células dendríticas tolerogênicas que programam as células T imaturas (“prime naive T cells”) a se tornarem células T_{reg} secretoras de IL-10 e TGF- β .²⁶⁹⁻²⁷⁰ As células dendríticas coletam macromoléculas das camadas mucosas através de fagocitose trans-epitelial.²⁷¹ As células dendríticas orais (células orais de Langerhans, oLC) expressam constitutivamente altos níveis do receptor de alta afinidade para a fração Fc do IgE (Fc ϵ RI) ocupada por moléculas de IgE que parecem ser essenciais para a coleta dos antígenos.²⁷² Esta coleta realizada em condições livres de inflamação atenua a maturação da célula dendrítica, aumenta a sua capacidade migratória e sua capacidade de produzir citocinas tolerogênicas como a IL-10 e o TGF- β .²⁷³ O aumento na massa molecular induzido pela polimerização enzimática poderia teoricamente estimular a fagocitose oral e interferir com a absorção da β -Lg pelos receptores de lipocalina.¹⁹¹ Assim, a habilidade do IgE específico contra a proteína nativa de ligar-se ao alérgoide é essencial e deve ser avaliada antes que uma estratégia de indução de tolerância seja aplicada em ensaios clínicos. A transglutaminase pode ser também utilizada para criar ligações covalentes entre diferentes proteínas. Demonstrou-se que a fusão recombinante de proteínas alérgicas e proteínas bacterianas imunogênicas estimula a atividade das células dendríticas.²⁷⁴ Esta habilidade da transglutaminase de unir

covalentemente as proteínas pode, teoricamente, ser utilizada para aumentar a atividade tolerogênica do alérgoide pela adição de coadjuvantes bacterianos selecionados. Este é um tópico que também necessita de estudos específicos.

Nossos resultados suportam o conceito que a polimerização enzimática é uma ferramenta que diminui a alergenicidade *in vivo* da β -Lg. A polimerização também não diminuiu a imunorreatividade humoral *in vitro*, nem a imunorreatividade celular *ex vivo* da β -Lg. Portanto, a polimerização pela transglutaminase representa uma técnica promissora para produzir moléculas adequadas para o desenvolvimento de estratégias e protocolos de dessensibilização sublingual/oral no tratamento das alergias alimentares.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

6.1 Quanto à influência da polimerização pela transglutaminase (em presença de cisteína) na imunorreatividade IgE-mediada *IN VIVO* contra a β -Lg em seres humanos com hipersensibilidade ao leite de vaca.

Tanto no grupo de participantes adultos, quanto no grupo de crianças, o teste t pareado demonstrou que as diferenças entre a imunorreatividade desencadeada pelos testes cutâneos contra a β -Lg e contra a TgPol β -Lg foram significativas ($p < 0,05$).

Portanto, rejeitamos a hipótese nula e ficamos com a hipótese alternativa:

Hipótese 1: A imunorreatividade humoral *IN VIVO* contra a β -Lg polimerizada pela TG (em presença de cisteína) não é equivalente à imunorreatividade humoral *IN VIVO* contra a β -Lg nativa em crianças e adultos com hipersensibilidade ao leite de vaca.

6.2 Quanto à influência da polimerização pelo aquecimento na imunorreatividade IgE-mediada *IN VITRO* contra a β -Lg.

O teste t pareado demonstrou nos participantes adultos que as diferenças entre as imunorreatividades mensuradas pela densidade óptica média corrigida nas bandas observadas a 72 kDa (tetrâmero), 36 kDa (dímero) e 18 kDa (monômero) foram todas significativas entre si ($p < 0,05$).

Portanto, rejeitamos a hipótese nula e ficamos com a hipótese alternativa:

Hipótese 1: A imunorreatividade humoral *IN VITRO* contra a β -Lg polimerizada pelo aquecimento não é equivalente à imunorreatividade humoral *IN VITRO* contra a β -Lg nativa em crianças e adultos com hipersensibilidade ao leite de vaca.

6.3 Quanto à influência da polimerização pela transglutaminase (em presença de cisteína) na imunorreatividade celular *EX VIVO* contra a β -Lg..

No grupo de participantes avaliados comparativamente quanto à imunorreatividade mediada por células (independente do *status* humoral mediado por IgE) contra a β -Lg e TgPol β -Lg conforme enfrentamento antigênico *ex vivo* monitorado pelo teste de inibição da aderência leucocitária, não houve diferença significativa entre os grupos, ocorrendo também uma correlação significativa entre os testes pareados. Rejeitamos, portanto a hipótese alternativa, uma vez que nossos dados favorecem a hipótese nula:

Hipótese 0: A imunorreatividade celular contra a β -Lg polimerizada pela transglutaminase em presença de cisteína é equivalente à imunorreatividade celular contra a β -Lg nativa em indivíduos sem histórico de hipersensibilidade ao leite de vaca.

6.4 Quanto à incidência de hipersensibilidade mediada por IgE em indivíduos adultos com hipolactasia refratária à dieta de exclusão de lactose.

No grupo de participantes adultos sintomáticos, dos 56 pacientes, apenas 4 não reagiram a nenhum teste de detecção de IgE específico (7,1%). Se considerarmos a reatividade a qualquer teste como critério diagnóstico de sensibilidade mediada por IgE, então a incidência de sensibilização mediada por IgE à β -Lg na população amostral de indivíduos com hipolactasia refratária à dieta de exclusão de lactose é de 92,9%.

No grupo controle de 20 participantes adultos assintomáticos, houve evidência de sensibilização em apenas um indivíduo, ou seja a incidência de sensibilização mediada por IgE à β -Lg na população amostral de indivíduos assintomáticos foi de 5%. A diferença entre os resultados do imunoblote entre os dois grupos foi significativa no teste do Chi-quadrado e no teste de Fisher ($p < 0,05$)

Em decorrência da significativa diferença observada em nossa casuística, rejeitamos a hipótese nula e ficamos com a hipótese alternativa²⁶¹:

Hipótese 1: Pacientes adultos com hipolactasia refratária à dieta de exclusão de lactose têm maior incidência de hipersensibilidade mediada por IgE contra as proteínas do leite de vaca do que a população tolerante ao leite de vaca.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de ser um diagnóstico freqüentemente realizado na prática clínica, a alergia é uma doença de difícil caracterização, em especial, as alergias alimentares.

O que se costuma chamar de “padrão ouro” para o diagnóstico da alergia alimentar é a prova de provocação oral, que na realidade é uma prova de hipersensibilidade cujo resultado não põe em evidência mecanismos imunes em particular.

Por outro lado, as evidências de sensibilização não confirmam necessariamente uma ligação entre os sintomas e os mecanismos imunes demonstrados, assim como a inexistência dessas evidências também não descarta a presença do mecanismo imune.

As ferramentas clínicas de que dispõem os médicos para a detecção destes mecanismos imunes, apesar de serem muito específicos, são pouco sensíveis. Em nossa casuística a dosagem de IgE por ImmunoCAP abaixo dos limites de detecção, ou o teste cutâneo-alérgico não reagente, não descartaram a possibilidade de sensibilização mediada por IgE, que foi mostrada pelo imunoblote.

A polimerização pela transglutaminase utilizada em queijos e iogurtes pode alterar a alergenicidade destas proteínas, e mesmo diminuí-la em pacientes com alergia às proteínas do leite de vaca. As proteínas derivadas da polimerização industrial de laticínios podem apresentar epítomos próprios e desenvolver quadros de imunorreatividade distintos da imunorreatividade às proteínas naturais, que até o momento foram insuficientemente estudados.

A polimerização pela transglutaminase, uma vez que diminui a alergenicidade e não altera significativamente a imunorreatividade mediada por células é um modelo estratégico promissor para o planejamento de protocolos terapêuticos de dessensibilização e indução de tolerância oral/sublingual.²⁷⁵

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bernard C. [Lessons of Experimental Physiology Applied to Medicine] http://books.google.com/books?id=tgIAAAAAQAAJ&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_similarbooks_r&cad=2_2#PPR3,M1 em 07 de março de 2010. Paris: Bailliere, 1855:510.
2. Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol* 2008; 1:31-7.
3. Savolainen P, Zhang YP, Luo J, Lundeberg J, Leitner T. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science* 2002; 298:1610-3.
4. Hare B, Brown M, Williamson C, Tomasello M. The domestication of social cognition in dogs. *Science* 2002; 298:1634-6.
5. White R. Husbandry and Herd Control in the Upper Paleolithic - a Critical-Review of the Evidence. *Current Anthropology* 1989; 30:609-32.
6. Burger J, Kirchner M, Bramanti B, Haak W, Thomas MG. Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:3736-41.
7. Leach HM. Human domestication reconsidered. *Current Anthropology* 2003; 44:349-68.
8. Balasse M, Bocherens H, Tresset A, Mariotti A, Vigne J-D. Émergence de la production laitière au Néolithique? Contribution de l'analyse isotopique d'ossements de bovins archéologiques. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science* 1997; 325:1005-10.
9. Singh M, Rosen CL, Chang KJ, Haddad GG. Plasma [beta]-Casomorphin-7 Immunoreactive Peptide Increases after Milk Intake in Newborn but not in Adult Dogs. *Pediatric Research* 1989; 26:34-8.
10. Gaull GE, Wright CE, Isaacs CE. Significance of growth modulators in human milk. *Pediatrics* 1985; 75:142-5.
11. Oski FA. Is bovine milk a health hazard? *Pediatrics* 1985; 75:182-6.
12. Roth-Walter F, Berin MC, Arnaboldi P, Escalante CR, Dahan S, Rauch J, et al. Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing

- uptake through Peyer's patches. *Allergy* 2008; 63:882-90.
13. Peroni DG, Piacentini GL, Bodini A, Pigozzi R, Boner AL. Transforming growth factor-beta is elevated in unpasteurized cow's milk. *Pediatr Allergy Immunol* 2009; 20:42-4.
 14. Cross ML, Stevenson LM, Gill HS. Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int Immunopharmacol* 2001; 1:891-901.
 15. Committee on Nutrition AAP. Water requirement in relation to osmolar load as it applies to infant feeding. *Pediatrics* 1957; 19:339-41.
 16. Committee on Nutrition AAP. Summary-The Early Feeds: Human Milk Versus Formula and Bovine Milk. *Pediatrics* 1985; 75:157-9.
 17. WHO. International Code of Marketing of Breast-milk Substitutes. Geneva: World Health Organization, 1981:13.
 18. Kalliomäki M, Ouwehand A, Arvilommi H, Kero P, Isolauri E. Transforming growth factor-[beta] in breast milk: A potential regulator of atopic disease at an early age. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999; 104:1251-7.
 19. Raiha NCR. Nutritional Proteins in Milk and the Protein Requirement of Normal Infants. *Pediatrics* 1985; 75:136-41.
 20. Foucard T. Development of Food Allergies with Special Reference to Cow's Milk Allergy. *Pediatrics* 1985; 75:177-81.
 21. Walker WA. Absorption of Protein and Protein Fragments in the Developing Intestine: Role in Immunologic/Allergic Reactions. *Pediatrics* 1985; 75:167-71.
 22. Besredka A. De l'anaphylaxie. Sixième memoire de l'anaphylaxie lactique. *Ann Inst Pasteur* 1909; 23:166-74.
 23. Tsuji NM, Kosaka A. Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells. *Trends Immunol* 2008; 29:532-40.
 24. Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004; 113:832-6.
 25. Dreborg S. The implications of nomenclature. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;

89:83-5.

26. Pratt EL. Food allergy and food intolerance in relation to the development of good eating habits. *Pediatrics* 1958; 21:642-8.
27. Venter C, Pereira B, Grundy J, Clayton CB, Roberts G, Higgins B, et al. Incidence of parentally reported and clinically diagnosed food hypersensitivity in the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:1118-24.
28. Lee LA, Burks AW. Food allergies: prevalence, molecular characterization, and treatment/prevention strategies. *Annu Rev Nutr* 2006; 26:539-65.
29. Bruijnzeel-Koomen C, Ortolani C, Aas K, Bindslev-Jensen C, Bjorksten B, Moneret-Vautrin D, et al. Adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. *Allergy* 1995; 50:623-35.
30. Johansson SGO, Hourihane JOB, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001; 56:813-24.
31. 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. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 126:S1-S58.
32. Sampson HA. Update on food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004; 113:805-19.
33. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genet Mol Res* 2003; 2:63-76.
34. Yang WH, Drouin MA, Herbert M, Mao Y, Karsh J. The monosodium glutamate symptom complex: assessment in a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:757-62.
35. Sanchez-Guerrero IM, Vidal JB, Escudero AI. Scombroid fish poisoning: a potentially life-threatening allergic-like reaction. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:433-4.
36. Mullen PE, Smith I. Tyramine metabolism and migraine: a metabolic defect. *Br J Pharmacol* 1971; 41:413P-4P.
37. Solé D, Silva LR, Rosário Filho N, Sarni ROS, Pastorino AC, Jacob CMA, et al.

- Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2007. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, 2008; 31:64-89.
38. Basinski T, Ozdemir C, Sackesen C, Mantel PY, Barlan I, Akdis M, et al. Highlights in cellular and molecular mechanisms of allergic diseases. XXVth Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology in Vienna. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 142:91-8.
 39. Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:638-46.
 40. Vaughan WT. Food allergens II. Trial diets in the elimination of allergenic foods. *J Immunol* 1931; 20:313-32.
 41. Untersmayr E, Scholl I, Swoboda I, Beil WJ, Forster-Waldl E, Walter F, et al. Antacid medication inhibits digestion of dietary proteins and causes food allergy: a fish allergy model in BALB/c mice. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:616-23.
 42. Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:763-8.
 43. Morita E, Kunie K, Matsuo H. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci* 2007; 47:109-17.
 44. Sicherer SH, Sampson HA. 9. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:S470-5.
 45. Cocco RR, Camelo-Nunes IC, Pastorino AC, Silva L, Sarni ROS, Rosario Filho NA, et al. Abordagem laboratorial no diagnóstico da alergia alimentar. *Revista Paulista de Pediatria* 2007; 25.
 46. Ahlstedt S, Holmquist I, Kober A, Perborn H. Accuracy of specific IgE antibody assays for diagnosis of cow's milk allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89:21-5.
 47. Philippe A, Eigenmann HAS. Interpreting skin prick tests in the evaluation of food allergy in children. *Pediatric Allergy and Immunology* 1998; 9:186-91.
 48. Gushken AK, Castro AP, Yonamine GH, Corradi GA, Pastorino AC, Jacob CM. Double-blind, placebo-controlled food challenges in Brazilian children: Adaptation

- to clinical practice. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2012.
49. Aihara Y, Kotoyori T, Takahashi Y, Osuna H, Ohnuma S, Ikezawa Z. The necessity for dual food intake to provoke food-dependent exercise-induced anaphylaxis (FEIAn): a case report of FEIAn with simultaneous intake of wheat and umeboshi. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:1100-5.
 50. Niggemann B. When is an oral food challenge positive? *Allergy* 2010; 65:2-6.
 51. Perry TT, Matsui EC, Conover-Walker MK, Wood RA. Risk of oral food challenges. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1164-8.
 52. Oliveira LS, Altman N, Castro APBM, Gushken AKF, Pastorino AC, Yonamine GH, et al. O teste de provocação oral DCPC é necessário para confirmação da tolerância ao leite de vaca em crianças com APLV? *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia* 2010; 33:129.
 53. Perry TT, Matsui EC, Kay Conover-Walker M, Wood RA. The relationship of allergen-specific IgE levels and oral food challenge outcome. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:144-9.
 54. Bengtsson U, Knutson TW, Knutson L, Dannaeus A, Hällgren R, Ahlstedt S. Eosinophil cationic protein and histamine after intestinal challenge in patients with cow's milk intolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1997; 100:216-21.
 55. Knutson TW, Bengtsson U, Dannaeus A, Ahlstedt S, Stålenheim G, Hällgren R, et al. Intestinal reactivity in allergic and nonallergic patients: An approach to determine the complexity of the mucosal reaction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1993; 91:553-9.
 56. Kurek M, Przybilla B, Hermann K, Ring J. A naturally occurring opioid peptide from cow's milk, beta-casomorphine-7, is a direct histamine releaser in man. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 97:115-20.
 57. Gell PGH, Coombs RRA. Classification of Allergic Reactions Responsible for Clinical Hypersensitivity and Disease. In: Gell PGH, Coombs RRA, editors. *Clinical Aspects of Immunology*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1968. p. 575-96.
 58. Ashkenazi A, Levin S, Idar D, Or A, Rosenberg I, Handzel ZT. *In Vitro Cell-*

- Mediated Immunologic Assay for Cow's Milk Allergy. *Pediatrics* 1980; 66:399-402.
59. Vanto T, Smogorzewska EM, Viander M, Kalimo K, Koivikko A. Leukocyte migration inhibition test in children with cow milk allergy. *Allergy* 1987; 42:612-8.
 60. Motrich RD, Gottero C, Rezzonico C, Riera CM, Rivero V. Cow's milk stimulated lymphocyte proliferation and TNFalpha secretion in hypersensitivity to cow's milk protein. *Clin Immunol* 2003; 109:203-11.
 61. Sato S, Tachimoto H, Shukuya A, Ogata M, Komata T, Imai T, et al. Utility of the peripheral blood basophil histamine release test in the diagnosis of hen's egg, cow's milk, and wheat allergy in children. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155 Suppl 1:96-103.
 62. Sicherer SH, Wood RA, Stablein D, Burks AW, Liu AH, Jones SM, et al. Immunologic features of infants with milk or egg allergy enrolled in an observational study (Consortium of Food Allergy Research) of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*; 125:1077-83 e8.
 63. Wells HG. Studies on the chemistry of anaphylaxis (III). Experiments with isolated proteins, especially those of the hen's egg. *Journal of Infectious Diseases* 1911; 9:147-71.
 64. Rajan TV. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol* 2003; 24:376-9.
 65. Sicherer SH. Food allergy. *Lancet* 2002; 360:701-10.
 66. Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:717-28.
 67. Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol* 1996; 14:1269-73.
 68. Linneberg A. The allergic march in early childhood and beyond. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:1419-21.
 69. Burks AW, Sampson HA. Anaphylaxis and food allergy. *Clin Rev Allergy Immunol* 1999; 17:339-60.
 70. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:27-36.

71. Ortolani C, Bruijnzeel-Koomen C, Bengtsson U, Bindselev-Jensen C, Bjorksten B, Host A, et al. Controversial aspects of adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI) Reactions to Food Subcommittee. *Allergy* 1999; 54:27-45.
72. Cox L, Williams B, Sicherer S, Oppenheimer J, Sher L, Hamilton R, et al. Pearls and pitfalls of allergy diagnostic testing: report from the American College of Allergy, Asthma and Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology Specific IgE Test Task Force. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 101:580-92.
73. Akdis CA, Blaser K, Akdis M. Apoptosis in tissue inflammation and allergic disease. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:717-23.
74. Coca AF, Cooke RA. On the classification of the phenomenon of hypersensitivities. *J Immunol* 1923; 8.
75. Niggemann B. Suggestions for a uniform terminology in allergology and pneumology. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19:99-107.
76. Sampson HA, Anderson JA. Summary and recommendations: Classification of gastrointestinal manifestations due to immunologic reactions to foods in infants and young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30 Suppl:S87-94.
77. Quirce S, Bombin C, Aleman A, Sastre J. Allergy to latex, fruit, and pollen. *Allergy* 2000; 55:896-8.
78. Kagalwalla AF, Shah A, Ritz S, Melin-Aldana H, Li BU. Cow's milk protein-induced eosinophilic esophagitis in a child with gluten-sensitive enteropathy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 44:386-8.
79. Hurrell JM, Genta RM, Melton SD. Histopathologic diagnosis of eosinophilic conditions in the gastrointestinal tract. *Adv Anat Pathol*; 18:335-48.
80. Yun MY, Cho YU, Park IS, Choi SK, Kim SJ, Shin SH, et al. Eosinophilic gastroenteritis presenting as small bowel obstruction: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol* 2007; 13:1758-60.
81. Savilahti E. Food-induced malabsorption syndromes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30 Suppl:S61-6.
82. Rosekrans PC, Meijer CJ, van der Wal AM, Lindeman J. Allergic proctitis, a

- clinical and immunopathological entity. *Gut* 1980; 21:1017-23.
83. Wedholm A, Larsen LB, Lindmark-Mansson H, Karlsson AH, Andren A. Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows. *J Dairy Sci* 2006; 89:3296-305.
 84. Monaci L, Tregoeat V, van Hengel A, Anklam E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research and Technology* 2006; 223:149-79.
 85. Wal JM. Structure and function of milk allergens. *Allergy* 2001; 56 Suppl 67:35-8.
 86. Scrimshaw NS, Murray EB. Lactose content of milk and milk products. *Am J Clin Nutr* 1988; 48:1099-104.
 87. Heck JM, van Valenberg HJ, Dijkstra J, van Hooijdonk AC. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *J Dairy Sci* 2009; 92:4745-55.
 88. Hippocrates. *Ancient Medicine - with an english translation by Jones W. H. S.* : Harvard University Press - available online on <http://www.archive.org/details/hippocrates01hippuoft>, Vol 1 - page 55 - 1923.
 89. Harrington LK, Mayberry JF. A re-appraisal of lactose intolerance. *International Journal of Clinical Practice* 2008; 62:1541-6.
 90. Bahna SL. Cow's milk allergy versus cow milk intolerance. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89:56-60.
 91. Bahna SL. Is it milk allergy or lactose intolerance? *Immunology and Allergy Clinics of North America* 1996; 16:187-98.
 92. Bulhoes AC, Goldani HA, Oliveira FS, Matte US, Mazzuca RB, Silveira TR. Correlation between lactose absorption and the C/T-13910 and G/A-22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult-type hypolactasia. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40:1441-6.
 93. Law D, Conklin J, Pimentel M. Lactose intolerance and the role of the lactose breath test. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:1726-8.
 94. Metz G, Jenkins DJA, Blendis LM. The British Society of Gastroenterology: Lactulose-hydrogen (H₂) breath test in health and disease. *Gut* 1976; 17:385-402.
 95. Douwes AC, Fernandes J, Degenhart HJ. Improved accuracy of lactose tolerance

- test in children, using expired H₂ measurement. *Arch Dis Child* 1978; 53:939-42.
96. Büning C, Genschel J, Jurga J, Fiedler T, Voderholzer W, Fiedler E-M, et al. Introducing Genetic Testing for Adult-Type Hypolactasia. *Digestion* 2005; 71:245-50.
 97. Fiocchi A, Bouygue GR, Albarini M, Restani P. Molecular diagnosis of cow's milk allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011; 11:216-21.
 98. Anthoni SR, Rasinpera HA, Kotamies AJ, Komu HA, Pihlajamaki HK, Kolho KL, et al. Molecularly defined adult-type hypolactasia among working age people with reference to milk consumption and gastrointestinal symptoms. *World J Gastroenterol* 2007; 13:1230-5.
 99. Savaiano DA, Levitt MD. Milk Intolerance and Microbe-Containing Dairy Foods. *J. Dairy Sci.* 1987; 70:397-406.
 100. Binsfeld B, Pastorino AC, Castro APBM, Yonamine GH, Gushken AKF, Jacob CMA. Conhecimento da rotulagem de produtos industrializados por familiares de pacientes com alergia a leite de vaca. *Revista Paulista de Pediatria* 2009; 27:296-302.
 101. Aboumahmoud R, Savello P. Crosslinking of Whey Protein by Transglutaminase. *J. Dairy Sci.* 1990; 73:256-63.
 102. Mattar R, Mazo DF. [Lactose intolerance: changing paradigms due to molecular biology]. *Rev Assoc Med Bras*; 56:230-6.
 103. Lam HY, van Hoffen E, Michelsen A, Guikers K, van der Tas CH, Bruijnzeel-Koomen CA, et al. Cow's milk allergy in adults is rare but severe: both casein and whey proteins are involved. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:995-1002.
 104. Ismail N, Soong L, McBride JW, Valbuena G, Olano JP, Feng HM, et al. Overproduction of TNF-alpha by CD8+ type 1 cells and down-regulation of IFN-gamma production by CD4+ Th1 cells contribute to toxic shock-like syndrome in an animal model of fatal monocytotropic ehrlichiosis. *J Immunol* 2004; 172:1786-800.
 105. Bosch AM. Classic galactosemia: dietary dilemmas. *J Inherit Metab Dis*; 34:257-60.
 106. ten Hoedt AE, Maurice-Stam H, Boelen CC, Rubio-Gozalbo ME, van Spronsen

- FJ, Wijburg FA, et al. Parenting a child with phenylketonuria or galactosemia: implications for health-related quality of life. *J Inher Metab Dis* 2011; 34:391-8.
107. Wang Y, Harvey CB, Hollox EJ, Phillips AD, Poulter M, Clay P, et al. The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology* 1998; 114:1230-6.
108. Hollox EJ, Poulter M, Zvarik M, Ferak V, Krause A, Jenkins T, et al. Lactase haplotype diversity in the Old World. *Am J Hum Genet* 2001; 68:160-72.
109. Poulter M, Hollox E, Harvey CB, Mulcare C, Peuhkuri K, Kajander K, et al. The causal element for the lactase persistence/non-persistence polymorphism is located in a 1 Mb region of linkage disequilibrium in Europeans. *Ann Hum Genet* 2003; 67:298-311.
110. Swallow DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet* 2003; 37:197-219.
111. Skovbjerg H, Sjostrom H, Noren O. Purification and characterisation of amphiphilic lactase/phlorizin hydrolase from human small intestine. *Eur J Biochem* 1981; 114:653-61.
112. Qiao R, Huang C, Du H, Zeng G, Li L, Ye S. Milk consumption and lactose intolerance in adults. *Biomed Environ Sci* 2011; 24:512-7.
113. Swagerty DL, Jr., Walling AD, Klein RM. Lactose intolerance. *Am Fam Physician* 2002; 65:1845-50.
114. Scrimshaw NS, Murray EB. Problems in the interpretation of research products. *Am J Clin Nutr* 1988; 48:1137-9.
115. Shrier I, Szilagyi A, Correa JA. Impact of lactose containing foods and the genetics of lactase on diseases: an analytical review of population data. *Nutr Cancer* 2008; 60:292-300.
116. Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Jarvela I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet* 2002; 30:233-7.
117. Di Stefano M, Terulla V, Tana P, Mazzocchi S, Romero E, Corazza GR. Genetic test for lactase non-persistence and hydrogen breath test: is genotype better than phenotype to diagnose lactose malabsorption? *Dig Liver Dis* 2009; 41:474-9.

118. Ammar F, de Boissieu D, Dupont C. [Allergy to protein hydrolysates. Report of 30 cases]. *Arch Pediatr* 1999; 6:837-43.
119. Sackesen C, Assa'ad A, Baena-Cagnani C, Ebisawa M, Fiocchi A, Heine RG, et al. Cow's milk allergy as a global challenge. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011; 11:243-8.
120. Host A, Halken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy* 1990; 45:587-96.
121. Shek LP, Bardina L, Castro R, Sampson HA, Beyer K. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy* 2005; 60:912-9.
122. Brandão AC, Gusken AKF, Soubihe LAP, Oso KH, Pastorino AC, Castro APBM, et al. Alergia ao leite de vaca (ALV) com mecanismo fisiopatológico misto. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia* 2008; 31:196.
123. Wal JM. Bovine milk allergenicity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 93:S2-11.
124. Schouten B, van Esch BC, van Thuijl AO, Blokhuis BR, Groot Kormelink T, Hofman GA, et al. Contribution of IgE and immunoglobulin free light chain in the allergic reaction to cow's milk proteins. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:1308-14.
125. Dees SC. Some unsolved problems in clinical allergy: Observations on milk and egg hemagglutinating antibody titers in allergic children. *Pediatrics* 1972; 50:420-8.
126. S. Husby FSL, P. Hyltoft Petersen, S-E. Svehag,. Humoral Immunity to Dietary Antigens in Atopic Dermatitis. *Allergy* 1986; 41:379-85.
127. P. Hindocha CBSW. Histamine Release from Human Leucocytes by IgG4 Subclass in the Sera of Allergic Children. *Allergy* 1985; 40:523-8.
128. Adkinson NF, Sobotka AK, Lichtenstein LM. Evaluation of the Quantity and Affinity of Human IgG "Blocking" Antibodies. *J Immunol* 1979; 122:965-72.
129. Sara Tomicic, Gunilla Norrman, Karin Fälth-Magnusson, Maria C. Jenmalm, Irene Devenney, Malin Fagerås Böttcher. High levels of IgG4 antibodies to foods during infancy are associated with tolerance to corresponding foods later in life. *Pediatric Allergy and Immunology* 2009; 20:35-41.

130. Sampson HA. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:981-9.
131. Gaynour B, G. Sletten RH, Eliann Egaas, Trond S. Halstensen,. Changes in humoral responses to Beta-lactoglobulin in tolerant patients suggest a particular role for IgG₄ in delayed, non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Pediatric Allergy and Immunology* 2006; 17:435-43.
132. Kate Hicks GH. Role for food-specific IgG-based elimination diets. *Nutrition & Food Science* 2008; 38:404-16.
133. Kattan JD, Cocco RR, Jarvinen KM. Milk and soy allergy. *Pediatr Clin North Am* 2011; 58:407-26, x.
134. Silvia Daher ST, Dirceu Solé, Charles K. Naspitz, Francly Reis Da Silva Patrício, Ulysses Fagundes Neto, Mauro Batista De Morais,. Cow's milk protein intolerance and chronic constipation in children. *Pediatric Allergy and Immunology* 2001; 12:339-42.
135. Iacono G, Di Prima L, D'Amico D, Scalici C, Geraci G, Carroccio A. The "red umbilicus": a diagnostic sign of cow's milk protein intolerance. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42:531-4.
136. Salvatore S, Vandenplas Y. Gastroesophageal reflux and cow milk allergy: is there a link? *Pediatrics* 2002; 110:972-84.
137. Chuang S-L, Hayes PJ, Ogundipe E, Haddad M, MacDonald TT, Fell JM. Cow's milk protein-specific T-helper type I/II cytokine responses in infants with necrotizing enterocolitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2009; 20:45-52.
138. Castro-Coelho AP, Montenegro FG, Meireles PR, Borges DB, Castro FM, Kalil J, et al. Broncospasmo induzido por corticóide inalatório em paciente com alergia à proteína do leite de vaca - relato de caso. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia* 2011; 34:137.
139. Bosetti M, Ispano M, Rotondo F, Ansaloni R, Ortolani C. Anaphylaxis resulting in death after inhalation of milk protein. *Allergy* 1997; 52:121.
140. Vargiu A, Vargiu G, Locci F, Del Giacco S, Del Giacco G. Hypersensitivity reactions from inhalation of milk proteins. *Allergy* 1994; 49:386 - 7.
141. Vanto T, Juntunen-backman K, Kalimo K, Klemola T, Koivikko A, Koskinen P, et

- al. The patch test, skin prick test, and serum milk-specific IgE as diagnostic tools in cow's milk allergy in infants. *Allergy* 1999; 54:837-42.
142. Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001; 107:891-6.
143. Gjesing B, Osterballe O, Schwartz B, Wahn U, Lowenstein H. Allergen-specific IgE antibodies against antigenic components in cow milk and milk substitutes. *Allergy* 1986; 41:51-6.
144. Bousquet J, Chanez P, Chanal I, Michel FB. Comparison between RAST and Pharmacia CAP system: a new automated specific IgE assay. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:1039-43.
145. Watanabe LA, Beck CML, Higa M, Gushken AKF, Yonamine GH, Fomin ABF, et al. Comparação entre ImmunoCAP e teste cutâneo de hipersensibilidade imediata na avaliação da alergia às proteínas do leite de vaca IgE mediada em crianças. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia* 2010; 33.
146. Goldman AS, Sellars WA, Halpern SR, Anderson DWJ, Furlow TE, Johnson CHJ. Milk Allergy. II. Skin Testing of Allergic and Normal Children with Purified Milk Proteins. *Pediatrics* 1963; 32:572-9.
147. Goldman AS, Anderson DW, Jr., Sellers WA, Saperstein S, Kniker WT, Halpern SR. Milk Allergy: I. Oral Challenge with Milk and Isolated Milk Proteins in Allergic Children. *Pediatrics* 1963; 32:425-43.
148. de Boissieu D, Dupont C. Allergie au lait de vache non IgE-médiée. *Arch Pediatr* 2006; 13:1471-3.
149. Butler HL, Byrne WJ, Marmer DJ, Euler AR, Steele RW. Depressed Neutrophil Chemotaxis in Infants with Cow's Milk and/or Soy Protein Intolerance. *Pediatrics* 1981; 67:264-8.
150. Eigenmann PA, Belli DC, Ludi F, Kahn JM, Polla BS. In vitro lymphocyte proliferation with milk and a casein-whey protein hydrolyzed formula in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96:549-57.
151. Sicherer SH, Wood RA, Stablein D, Burks AW, Liu AH, Jones SM, et al. Immunologic features of infants with milk or egg allergy enrolled in an observational study (Consortium of Food Allergy Research) of food allergy. *J*

- Allergy Clin Immunol 2010; 125:1077-83 e8.
152. Jacob CMA, Pastorino AC, Azevedo AM, Tanikawa CE, Vaz M, Grumach AS. Utilização de um Preparado de Proteína Isolada de Soja na Alergia a Leite de Vaca. Revista Paulista de Medicina 1998; 16:87-90.
 153. Castro APBM, Jacob CMA, Corradi GA, Abdalla D, Gonçalves RFF, Rocha FTL, et al. Evolução clínica e laboratorial de crianças com alergia a leite de vaca e ingestão de bebida à base de soja. Revista Paulista de Pediatria 2005; 23:27-34.
 154. Yonamine GH, Castro APBM, Pastorino AC, Jacob CMA. Uso de fórmulas à base de soja na alergia à proteína do leite de vaca. Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia 2011; 34:187-92.
 155. Shabo Y, Barzel R, Margoulis M, Yagil R. Camel milk for food allergies in children. Isr Med Assoc J 2005; 7:796-8.
 156. Castro-Coelho AP, Galvão VR, Meireles PR, Borges DB, Castro FM, Kalil J, et al. Avaliação da qualidade de vida em pacientes alérgicos a proteína do leite de vaca submetidos a dessensibilização oral. Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia 2011; 34:116.
 157. Bird JA. Food Allergy: Update on Clinical Interventions Leading to Desensitization and Tolerance. Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology 2010; 23:231-6.
 158. Castro APBM, Watanabe LA, Fucci VZ, Fomin ABF, Ribeiro LMA, Gushken AKF, et al. IgE-mediated cow's milk allergy in Brazilian children: tolerance development at five years of age. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 2010; 125:S192-S.
 159. Jacob CMA, Pastorino AC, Fomin ABF, Watanabe LA, Fucci VZ, Gushken AKF, et al. Prognostic factors associated to persistent IgE-mediated cow's milk allergy. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 2010; 125:S179-S.
 160. Saarinen KM, Pelkonen AS, Makela MJ, Savilahti E. Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. J Allergy Clin Immunol 2005; 116:869-75.
 161. Meireles PR, Borges DB, Bittar RP, Castro-Coelho AP, Castro FM, Kalil J, et al. Avaliação da resposta clínica e laboratorial de pacientes com anafilaxia a proteína do leite de vaca submetidos a dessensibilização oral. Revista Brasileira

- de Alergia e Imunopatologia 2011; 34:116.
162. Meglio P, Bartone E, Plantamura M, Arabito E, Giampietro PG. A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy* 2004; 59:980-7.
 163. Longo G, Barbi E, Berti I, Meneghetti R, Pittalis A, Ronfani L, et al. Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:343-7.
 164. Keet CA, Frischmeyer-Guerrerio PA, Thyagarajan A, Schroeder JT, Hamilton RG, Boden S, et al. The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* in press.
 165. Roso MG, Portilho NC, Meireles PR, Lima GP, Kalil J, Castro FM, et al. Reações Adversas ocorridas durante a dessensibilização oral a proteína do leite de vaca. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia* 2011; 34:122.
 166. Caminiti L, Passalacqua G, Barberi S, Vita D, Barberio G, De Luca R, et al. A new protocol for specific oral tolerance induction in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy Asthma Proc* 2009; 30:443-8.
 167. Marsh DG, Lichtenstein LM, Campbell DH. Studies on "allergoids" prepared from naturally occurring allergens. I. Assay of allergenicity and antigenicity of formalinized rye group I component. *Immunology* 1970; 18:705-22.
 168. Valenta R, Niederberger V. Recombinant allergens for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:826-30.
 169. Kim JS, Nowak-Wegrzyn A, Sicherer SH, Noone S, Moshier EL, Sampson HA. Dietary baked milk accelerates the resolution of cow's milk allergy in children. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128:125-31 e2.
 170. Vila L, Beyer K, Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:1599-606.
 171. Konstantinou GN, Kim JS. Paradigm Shift in the Management of Milk and Egg Allergy: Baked Milk and Egg Diet. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2012; in press.
 172. Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific

- immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:761-71.
173. Olivier CE, Villas-Boas MB, Netto FM, Zollner RdL. Allergenicity of Bos d 5 in children with cow's milk allergy is reduced by transglutaminase polymerization. *Ped Allergy Immunol Pulmonol* 2012; 25:30-3.
 174. Koda YKL. Alergia à proteína do leite de vaca. *Pediatrics (São Paulo)* 1985; 7:62-6.
 175. Goldman AS, Anderson Jr DW, Sellers WA, Saperstein S, Kniker WT, Halpern SR. Milk Allergy. I. Oral Challenge with Milk and Isolated Milk Proteins in Allergic Children. *Pediatrics* 1963; 32:425-43.
 176. Sorva R, Makinen-Kiljunen S, Juntunen-Backman K. Beta-lactoglobulin secretion in human milk varies widely after cow's milk ingestion in mothers of infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93:787-92.
 177. Restani P, Gaiaschi A, Plebani A, Beretta B, Velona T, Cavagni G, et al. Evaluation of the presence of bovine proteins in human milk as a possible cause of allergic symptoms in breast-fed children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 84:353-60.
 178. Bertino E, Prandi GM, Fabris C, Cavaletto M, Di Martino S, Cardaropoli S, et al. Human milk proteins may interfere in ELISA measurements of bovine beta-lactoglobulin in human milk. *Acta Paediatr* 1996; 85:543-9.
 179. Bovine beta-lactoglobulin precursor P02754 at <http://www.uniprot.org/uniprot/P02754>. The Uniprot Consortium, Accessed at 15 november, 2010.
 180. Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. Invited Review: {beta}-Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *J. Dairy Sci.* 2004; 87:785-96.
 181. Sub-Committee AN. The Official list of allergens. <http://www.allergen.org/Allergen.aspx>: International Union of Immunological Societies, 2008.
 182. Chapman MD, Pomés A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature and structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007; 119:414-20.
 183. Breiteneder H, Mills EN. Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin*

- Immunol 2005; 115:14-23.
184. Kuwata K, Hoshino M, Forge V, Era S, Batt CA, Goto Y. Solution structure and dynamics of bovine beta-lactoglobulin A. *Protein Sci* 1999; 8:2541-5.
 185. Bin Y, Qin GBJ, Maria C, Bewley, Edward N, Baker, Lawrence K. Creamer,. Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine beta-lactoglobulin. *Protein Science* 1999; 8:75-83.
 186. Maier I, Okun VM, Pittner F, Lindner W. Changes in peptic digestibility of bovine beta-lactoglobulin as a result of food processing studied by capillary electrophoresis and immunochemical methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 841:160-7.
 187. Kurisaki J, Nakamura S, Kaminogawa S, Yamauchi K. Antigenic properties of beta-lactoglobulin examined with mouse IgE antibody. *Agricultural and Biological Chemistry Journal* 1982; 48:2069-75.
 188. Otani H, Uchio T, Tokita F. Antigenic reactivities of chemically modified beta-lactoglobulins with antiserum to bovine beta-lactoglobulin. *Agricultural and Biological Chemistry Journal* 1985; 49:2531-6.
 189. Clement G, Boquet D, Frobert Y, Bernard H, Negroni L, Chatel J-M, et al. Epitopic characterization of native bovine β^2 -lactoglobulin. *Journal of Immunological Methods* 2002; 266:67-78.
 190. M. Kuitunen ES, A. Sarnesto,. Human alfa-lactalbumin and bovine beta-lactoglobulin absorption in infants. *Allergy* 1994; 49:354-60.
 191. Fluckinger M, Merschak P, Hermann M, Haertle T, Redl B. Lipocalin-interacting-membrane-receptor (LIMR) mediates cellular internalization of beta-lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778:342-7.
 192. Husby S, Jensenius JC, Svehag SE. Passage of undegraded dietary antigen into the blood of healthy adults. Quantification, estimation of size distribution, and relation of uptake to levels of specific antibodies. *Scand J Immunol* 1985; 22:83-92.
 193. Husby S, Host A, Teisner B, Svehag SE. Infants and children with cow milk allergy/intolerance. Investigation of the uptake of cow milk protein and activation of the complement system. *Allergy* 1990; 45:547-51.

194. Duchateau M, Lambert, Gossart, Casimir. Anti-betalactoglobulin IgG antibodies bind to a specific profile of epitopes when patients are allergic to cow's milk proteins. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:824-33.
195. Nowak-Wegrzyn A, Bloom KA, Sicherer SH, Shreffler WG, Noone S, Wanich N, et al. Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:342-7.e2.
196. Williams SC, Badley RA, Davis PJ, Puijk WC, Meloen RH. Identification of epitopes within beta lactoglobulin recognised by polyclonal antibodies using phage display and PEPSCAN. *Journal of Immunological Methods* 1998; 213:1-17.
197. Sotto D, Tounian P, Baudon JJ, Pauliat S, Challier P, Fontaine JL, et al. L'allergie aux hydrolysats de protéines du lait de vache. À propos de huit cas. *Archives de Pédiatrie* 1999; 6:1279-85.
198. R. Inoue SM, H. Kaneko, S. Shinoda, H. Sakaguchi, Y. Nishimura, N. Kondo,. Identification of β -lactoglobulin-derived peptides and class II HLA molecules recognized by T cells from patients with milk allergy. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:1126-34.
199. Takahashi T, Kaminogawa S, Kuwata T, Ando O, Yamauchi K. T Cell Recognition of β -Lactoglobulin. *Agricultural and Biological Chemistry* 1988; 52:2485-91.
200. Inoue R, Matsushita S, Kaneko H, Shinoda S, Sakaguchi H, Nishimura Y, et al. Identification of beta-lactoglobulin-derived peptides and class II HLA molecules recognized by T cells from patients with milk allergy. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:1126-34.
201. Eissa AS, Bislam S, Khan SA. Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. *J Agric Food Chem* 2004; 52:4456-64.
202. Jaros D, Partschfeld C, Henle T, Rohm H. Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. *Journal of Texture Studies* 2006; 37:113-55.
203. Cozzolino A, Di Pierro P, Mariniello L, Sorrentino A, Masi P, Porta R. Incorporation of whey proteins into cheese curd by using transglutaminase. *Biotechnol Appl Biochem* 2003; 38:289-95.

204. Eissa AS, Puhl C, Kadla JF, Khan SA. Enzymatic Cross-Linking of β -Lactoglobulin: Conformational Properties Using FTIR Spectroscopy. *Biomacromolecules* 2006; 7:1707-13.
205. Piacentini M, Colizzi V. Tissue transglutaminase: apoptosis versus autoimmunity. *Immunology Today* 1999; 20:130-4.
206. Dahele AV, Aldhous MC, Humphreys K, Ghosh S. Serum IgA tissue transglutaminase antibodies in coeliac disease and other gastrointestinal diseases. *QJM* 2001; 94:195-205.
207. Pedersen MH, Hansen TK, Sten E, Seguro K, Ohtsuka T, Morita A, et al. Evaluation of the potential allergenicity of the enzyme microbial transglutaminase using the 2001 FAO/WHO Decision Tree. *Mol Nutr Food Res* 2004; 48:434-40.
208. Jaros D, Partschefeld C, Henle T, Rohm H. Transglutaminase in Dairy Products: Chemistry, Physics, Applications. *Journal of Texture Studies* 2006; 37:113-55.
209. Færgemand M, Qvist KB. On the importance of using a Ca²⁺ independent transglutaminase for cross-linking of [beta]-lactoglobulin. *Food Hydrocolloids* 1999; 13:199-201.
210. Lee DN, Moore EE, Merson RL. Electrophoresis of Cottage Cheese Whey Proteins and Their Polymers. *Journal of Dairy Science* 1975; 58:658-67.
211. Villas-Boas MB, Vieira KP, Trevizan G, Zollner RL, Netto FM. The effect of transglutaminase-induced polymerization in the presence of cysteine on [beta]-lactoglobulin antigenicity. *International Dairy Journal* 2010; 20:386-92.
212. FAO/WHO. Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO) 2001:27.
213. HayGlass KT, Strejan GH. Antigen- and IgE class-specific suppression mediated by T suppressor cells of mice treated with glutaraldehyde-polymerized ovalbumin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1983; 71:23-31.
214. Ferrari E, Breda D, Longhi R, Vangelista L, Nakaie CR, Elviri L, et al. In Search of a Vaccine for Mouse Allergy: Significant Reduction of Mus m 1 Allergenicity by Structure-Guided Single-Point Mutations. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 157:226-37.

215. Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Ebner C. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:707-13.
216. Bullen AW, Losowsky MS. Comparison of a leucocyte adherence test with the leucocyte migration inhibition test and skin reactivity to PPD. *Clin Exp Immunol* 1978; 31:408-13.
217. Halliday WJ, Miller S. Leukocyte adherence inhibition: a simple test for cell-mediated tumour immunity and serum blocking factors. *Int J Cancer* 1972; 9:477-83.
218. Halliday WJ. Historical Background and Aspects of the Mechanism of Leukocyte Adherence Inhibition. *Cancer Res* 1979; 39:558-63.
219. Kuratsuji T. Studies on leukocyte adherence inhibition test. Part II. Clinical applications of LAI test to detect delayed type hypersensitivity in infants and children. *Keio J Med* 1981; 30:65-9.
220. Villas-Bôas MB. Efeito da Enzima Transglutaminase na antigenicidade da β -Lactoglobulina. Tese de Mestrado Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: State University, 2008:93.
221. Stanic D, Monogioudi E, Dilek E, Radosavljevic J, Atanaskovic-Markovic M, Vuckovic O, et al. Digestibility and allergenicity assessment of enzymatically crosslinked beta-casein. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54:1273-84.
222. Villas-Boas MB, Fernandes MA, Zollner RL, Netto FM. Effect of polymerization with transglutaminase on in vitro digestion and antigenicity of beta-lactoglobulin. *International Dairy Journal* 2012.
223. Seva-Pereira A, Silva RC, Pereira-Filho RA. [Lactose malabsorption diagnosis with H₂ breath test]. *Arq Gastroenterol* 1999; 36:18-26.
224. Verstege A, Mehl A, Rolinck-Werninghaus C, Staden U, Nocon M, Beyer K, et al. The predictive value of the skin prick test weal size for the outcome of oral food challenges. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1220-6.
225. Costa AJF, Sarinho ESC, Motta MEFA, Gomes PN, Melo SMO, Silva GAP. Allergy to cow's milk proteins: what contribution does hypersensitivity in skin tests

- have to this diagnosis? *Pediatric Allergy and Immunology* 2011; 22:e133-e8.
226. Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI, Hamilton R, Spector SL, Tan R, et al. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 100:S1-148.
227. Cohen JB. *Practical Organic Chemistry - Historical Digital Edition* available at <http://www.archive.org/stream/practicalorganic00coheuoft>. 2nd ed. London: Macmillan and Co.; 1920.
228. Fernandes MA. Efeito da enzima transglutaminase na digestibilidade e antigenicidade da β -lactoglobulina. Tese de Mestrado. Departamento de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2009.
229. Weber K, Pringle JR, Osborn M. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol* 1972; 26 PtC:3-27.
230. Pukac LA, Carter JE, Morrison KS, Karnovsky MJ. Enhancement of diaminobenzidine colorimetric signal in immunoblotting. *Biotechniques* 1997; 23:385-8.
231. Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J. Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* 2009; 30:1845-55.
232. Hahn T, Levin S, Handzel ZT. Leucocyte migration inhibition factor (LIF) production by lymphocytes of normal children, newborns, and children with immune deficiency. *Clin Exp Immunol* 1976; 24:448-54.
233. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 1962; 115:453-66.
234. Sjogren HO, Hellstrom I, Bansal SC, Hellstrom KE. Suggestive evidence that the "blocking antibodies" of tumor-bearing individuals may be antigen-antibody complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68:1372-5.
235. Dgani R, Shani A, Elchalal U, Harpaz N, Bentwich Z, Fink A. The leukocyte adherence inhibition test (LAI) in preoperative diagnosis of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1993; 49:349-53.
236. Walters BA, Chick JE, Halliday WJ. Cell-mediated immunity and serum blocking factors in patients with chronic dermatophytic infections. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1974; 46:849-57.

237. Ashkenazi A, Idar D, Handzel ZT, Ofarim M, Levin S. An in-vitro immunological assay for diagnosis of coeliac disease. *Lancet* 1978; 1:627-9.
238. Kuratsuji T. Studies on leukocyte adherence inhibition test. Part I. Studies on mechanisms of leukocyte adherence inhibition. *Keio J Med* 1981; 30:53-63.
239. Powell AE, Sloss AM, Smith RN. Leukocyte-Adherence Inhibition: A Specific Assay of Cell-Mediated Immunity Dependent on Lymphokine-Mediated Collaboration between T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 1978; 120:1957-66.
240. Dunn IS, Halliday WJ. Interactions between T and B lymphocytes and macrophages in the production of leukocyte adherence inhibition factor. *Cell Immunol* 1980; 52:48-61.
241. Tong AW, Burger DR, Finke P, Barney C, Vandenbark AA, Vetto RM. Assessment of the mechanism of the leukocyte adherence inhibition test. *Cancer Res* 1979; 39:597-603.
242. Dunn IS, Halliday WJ. Subpopulations of splenic T and B lymphocytes producing and regulating leukocyte adherence inhibition factor. *Cell Immunol* 1980; 56:465-77.
243. Holt PG, Roberts LM, Fimmel PJ, Keast D. The L.A.I. microtest: a rapid and sensitive procedure for the demonstration of cell-mediated immunity in vitro. *J Immunol Methods* 1975; 8:277-88.
244. Greaves MF, Raff MC. Specificity of anti-theta sera in cytotoxicity and functional tests on T lymphocytes. *Nat New Biol* 1971; 233:239-41.
245. Iwabuchi K, Yamashita T. Platelet-derived neutrophil adherence-inhibiting factor in humans. *Blood* 1990; 76:2368-73.
246. Fink A, Bibi H, Eliraz A, Tabachnik E, Bentwich Z. Leukotrienes (LTC₄, LTD₄) confer glass non-adherence on leukocytes of asthmatic individuals. Dependency on cyclooxygenase products and calcium ion. *Immunol Lett* 1985; 10:319-23.
247. Fink A, Shahin R, Eliraz A, Bibi H, Berkenstadt H, Levin S, et al. Interferon modulates the leukotriene C₄-induced non-adherence properties of leukocytes: acquisition of an asthmatic phenotype. *Immunol Lett* 1985; 10:159-63.
248. Fink A, Bibi H, Eliraz A, Schlesinger M, Bentwich Z. Ketotifen, disodium

- cromoglycate, and verapamil inhibit leukotriene activity: determination by tube leukocyte adherence inhibition assay. *Ann Allergy* 1986; 57:103-6.
249. Tamayo-Sarver JH, Albert JM, Tamayo-Sarver M, Cydulka RK. Advanced statistics: how to determine whether your intervention is different, at least as effective as, or equivalent: a basic introduction. *Acad Emerg Med* 2005; 12:536-42.
 250. Linnet K. Limitations of the paired t-test for evaluation of method comparison data. *Clin Chem* 1999; 45:314-5.
 251. Guyatt G, Jaeschke R, Heddle N, Cook D, Shannon H, Walter S. Basic statistics for clinicians: 1. Hypothesis testing. *CMAJ* 1995; 152:27-32.
 252. Fiocchi A, Schunemann HJ, Brozek J, Restani P, Beyer K, Troncone R, et al. Diagnosis and Rationale for Action Against Cow's Milk Allergy (DRACMA): a summary report. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Dec;126(6):1119-28 e12.
 253. Vlieg-Boerstra BJ, van der Heide S, Bijleveld CM, Kukler J, Duiverman EJ, Wolt-Plompen SA, et al. Dietary assessment in children adhering to a food allergen avoidance diet for allergy prevention. *Eur J Clin Nutr*. 2006 Dec;60(12):1384-90.
 254. Barbi E, Berti I, Longo G. Food allergy: from the of loss of tolerance induced by exclusion diets to specific oral tolerance induction. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2008 Nov;2(3):212-4.
 255. Lehrer SB, Bannon GA. Risks of allergic reactions to biotech proteins in foods: perception and reality. *Allergy*. 2005 May;60(5):559-64.
 256. Szabo I, Eigenmann PA. Allergenicity of major cow's milk and peanut proteins determined by IgE and IgG immunoblotting. *Allergy* 2000; 55:42-9.
 257. Restani P, Gaiaschi A, Plebani A, Beretta B, Cavagni G, Fiocchi A, et al. Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:997-1004.
 258. Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* 1999; 402:B24-30.
 259. Gieras A, Focke-Tejkl M, Ball T, Verdino P, Hartl A, Thalhamer J, et al. Molecular determinants of allergen-induced effector cell degranulation. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:384-90.

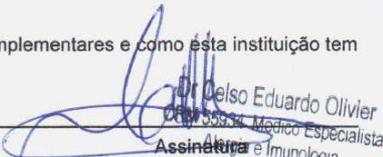
260. Chapman JA, Bernstein L, E. LR, Oppenheimer J. Food allergy: a practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 96:S1-68.
261. Olivier CE, Lorena SLS, Pavan CR, Santos RAPG, Lima RPS, Pinto DG, Silva MD, Zollner RL. Is it just lactose intolerance? *Allergy Asthma Proc* 2012; in press.
262. Portnoi PA, MacDonald A. Determination of the lactose and galactose content of cheese for use in the galactosaemia diet. *J Hum Nutr Diet* 2009; 22:400-8.
263. Rozenfeld P, Docena GH, Añón MC, and Fossati CA. Detection and identification of a soy protein component that cross-reacts with caseins from cow's milk. *Clin Exp Immunol*. 2002; 130:49-58.
264. Uhrinová S, Smith MH, Jameson GB, Uhrin D, Sawyer L, Barlow PN. Structural Changes Accompanying pH-Induced Dissociation of the Beta-Lactoglobulin Dimer. *Biochemistry*. 2000; 39(13):3565-74.
265. Labouré H, Cases E, Cayot P. Heat induced [beta]-lactoglobulin polymerization: role of the change in medium permittivity. *Food Chemistry*. 2004;85(3):399-406.
266. Lorenzen PC, Neve H, Mautner A, Schlimme E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *Int J Dairy Technol*. 2002;55(3):152-7.
267. Watanabe J, Tanabe S, Watanabe M, Shinmoto H, Sonoyama K. The production of hypoallergenic wheat flour and the analysis of its allergy suppressive effects. *Biofactors*. 2004;22(1-4):295-7.
268. Barrett NA, Maekawa A, Rahman OM, Austen KF, Kanaoka Y. Dectin-2 Recognition of House Dust Mite Triggers Cysteinyl Leukotriene Generation by Dendritic Cells. *J Immunol*. 2009 January 15, 2009;182(2):1119-28.
269. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol*. 2002 Oct;80(5):477-83.
270. Berin MC, Sicherer S. Food allergy: mechanisms and therapeutics. *Curr Opin Immunol*. 2011 Sep 21;23(6):794-800.
271. Iwasaki A. Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:381-418.
272. Allam JP, Novak N, Fuchs C, Asen S, Berge S, Appel T, et al. Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high

- constitutive FcεRI expression. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jul;112(1):141-8.
- 273 Allam J-P, Würtzen PA, Reinartz M, Winter J, Vrtala S, Chen K-W, et al. Pfl p 5 resorption in human oral mucosa leads to dose-dependent and time-dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation, and enhances their migratory and TGF- β 1 and IL-10-producing properties. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(3):638-45.e1.
- 274 Gerstmayr M, Ilk N, Schabussova I, Jahn-Schmid B, Egelseer EM, Sleytr UB, et al. A novel approach to specific allergy treatment: the recombinant allergen-S-layer fusion protein rSbsC-Bet v 1 matures dendritic cells that prime Th0/Th1 and IL-10-producing regulatory T cells. *J Immunol.* 2007 Dec 1;179(11):7270-5.
- 275 Olivier CE, Lima RPS, Pinto DG, Santos RAPG, Silva GKM, Lorena SLS, et al. In Search of a Tolerance-Induction Strategy for Allergy to Cow's Milk: Significant Reduction of Beta-lactoglobulin Allergenicity via Transglutaminase/Cysteine Polymerization". *CLINICS (Sao Paulo)* 2012 *in press*.

ANEXOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

9 ANEXOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

9.1 Folha de rosto do SISNEP

 MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP			
FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS			FR - 194898
Projeto de Pesquisa Avaliação da Imunorreatividade à Beta-Lactoglobulina Bovina Nativa e Polimerizada em Pacientes Intolerantes ao Leite de vaca.			
Área de Conhecimento 4.00 - Ciências da Saúde - 4.01 - Medicina - Diag.		Grupo Grupo III	Nível Diagnóstico
Área(s) Temática(s) Especial(s)		Fase Não se Aplica	
Unitermos Imunorreatividade, Beta-lactoglobulina, Leite de Vaca, Intolerância			
Sujeitos na Pesquisa			
Nº de Sujeitos no Centro 100	Total Brasil 100	Nº de Sujeitos Total 100	Grupos Especiais Criança e ou menores de 18 anos,
Placebo NAO	Medicamentos HIV / AIDS NÃO	Wash-out NÃO	Sem Tratamento Específico NÃO
		Banco de Materiais Biológicos NÃO	
Pesquisador Responsável			
Pesquisador Responsável Celso Eduardo Olivier		CPF 102.105.518-28	Identidade 13.761.594 SSP/SP
Área de Especialização IMUNOALERGOLOGIA		Maior Titulação MÉDICO	Nacionalidade BRASILEIRO
Endereço R MAESTRO DIOGO HUGO BRATFISCHER, 70 B2-23		Bairro JARDIM MIRANDA	Cidade CAMPINAS - SP
Código Postal 13032-900	Telefone 19 34611692 / 19 34635941	Fax 19 34555726	Email docsystems@docsystems.med.br
Termo de Compromisso			
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não.			
Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.			
Data: <u>9 / 6 / 2008</u>		 Assinatura do Médico Especialista Celso Eduardo Olivier CRM 5387 Alergia e Imunologia	
Instituição Onde Será Realizado			
Nome UNICAMP/Faculdade de Ciências Médicas - SP		CNPJ 04.606.842/5000-13	Nacional/Internacional Nacional
Unidade/Órgão Faculdade de Ciências Médicas / Clínica Médica		Participação Estrangeira NÃO	Projeto Multicêntrico NÃO
Endereço Rua Tessália Vieira de Camargo 126		Bairro Barão Geraldo	Cidade Campinas - SP
Código Postal 13084970	Telefone 19 35218936	Fax 19 35218936	Email cep@fcm.unicamp.br
Termo de Compromisso			
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Nome: <u>Celso Eduardo Olivier</u>		 Assinatura do Médico Especialista Celso Eduardo Olivier CRM 5387 Alergia e Imunologia	
Data: <u>9 / 6 / 2008</u>			

9.2 Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa

	FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
	www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
CEP, 22/02/10. (Grupo III)	2ª VIA
PARECER CEP: Nº 409/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto) CAAE: 0332.0.146.000-08	
I - IDENTIFICAÇÃO:	
PROJETO: "AVALIAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE À BETA-LACTOGLOBULINA BOVINA NATIVA E POLIMERIZADA EM PACIENTES INTOLERANTES AO LEITE DE VACA". PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Celso Eduardo Olivier INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas / UNICAMP APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/06/2008 APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/06/09 (O formulário encontra-se no rite acima)	
II - OBJETIVOS	
Avaliar em pacientes clinicamente intolerantes ao leite de vaca a imunorreatividade da β -lactoglobulina polimerizada pela transferrina, comparando-a com a imunorreatividade à β -lactoglobulina nativa para determinar a importância relativa de cada componente no quadro clínico geral.	
III - SUMÁRIO	
Pretende-se propiciar aos pacientes portadores de intolerância de natureza imunológica a alimentos lácteos uma atenção diferenciada, no sentido de melhor compreender o seu problema e padronizar uma investigação imunológica específica que sirva como ferramenta para a orientação e condução do caso. A proposta metodológica segue as recomendações da Organização Mundial de Saúde e regulamentações específicas relacionadas à avaliação da alergia. Serão avaliados dois grupos de pacientes: pacientes provenientes do ambulatório de Imunoalergologia com suspeita clínica de alergia e/ou intolerância ao leite de vaca, com sintomas; e pacientes procedentes do ambulatório de doenças funcionais e de diarreia crônica da Gastroclínica com diagnóstico de intolerância à lactose confirmado. Os métodos diagnósticos empregados constam: testes cutâneos de sensibilidade imediata, testes de contato e dosagem de IgE específica.	
IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES	
O protocolo é bem descrito, destacando os cuidados em atender às normas já estabelecidas para diagnóstico. Os critérios de inclusão e exclusão foram apresentados. Como se tratam de menores, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido possui espaço para assinatura dos responsáveis, apesar de dirigido aos participantes da pesquisa. Há oportunidade de autorizar a coleta de sangue e sua estocagem no Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental até realização dos procedimentos. No entanto, na declaração de uso e armazenamento de material biológico, ao referir que o material biológico estocado não será utilizado para novas pesquisas sem o prévio consentimento do CEP, estabelece-se a dúvida quanto ao período de estocagem do material. O	
<hr/> Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 Caixa Postal 6111 13084-971 - Campinas - SP FONE (019) 3521-8934 FAX (019) 3521-7187 cep@fcm.unicamp.br	
- -	



orçamento previsto pretende ter como fonte de recursos a Fapesp ou outras agências de fomento. Há declaração do responsável do Laboratório Especializado de Gastroenterologia quanto ao encaminhamento dos pacientes após realização do diagnóstico de intolerância a lactose.

Recomendamos que seja esclarecido sobre a estocagem do material biológico e, se necessário, alterar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de junho de 2008.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP