

Faculdade de Ciências Farmacéuticas

Pós-Graduação em Análises Clínicas

**Alergia à proteína do leite de vaca (APLV):
uma perspectiva imunológica**

Sílvio César Zeppone

**ARARAQUARA
2008**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Alergia à proteína do leite de vaca (APLV):
uma perspectiva imunológica**

Aluno: Sílvio César Zeppone

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção ao título de mestre, pelo curso de pós-graduação em Análises Clínicas.

Área de concentração: Imunologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

ARARAQUARA
2008



Fonte: www.google.com.br

”... pela conscientização das mães sobre o verdadeiro papel do leite humano – o alimento ideal para o lactente, seja sob o aspecto sócio-econômico, seja, finalmente, sob o ponto de vista psicológico, na medida em que possibilita como um todo a consolidação da relação mãe-bebê – expressão viva de amor, razão primordial de qualquer relacionamento humano”

(Extraído do livro, Nutrição e dietética em pediatria, J. R. Woiski - 1)

À minha esposa Rosimeire Maria Orlando Zeppone, companheira e incentivadora, ouvido atento nos bons e maus momentos, amor da minha vida.

Às minhas filhas Gabriela e Lara Orlando Zeppone, o meu aprendizado constante como amigas no nosso dia a dia, desde bebês, depois crianças, e agora adolescentes, são pedras preciosas que abrilhantam meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pai criador do Universo pelos dons da vida em mais um capítulo da minha existência.

Tenho a certeza de que esta dissertação foi construída com o auxílio de muitas mãos.

Agradeço a todas as crianças e mães que voluntariamente participaram da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa, meu orientador, que dispensou uma parte do seu concorrido tempo na realização desta dissertação de mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas da FCF Unesp Araraquara, pela contribuição teórica e formação de pesquisa.

Agradeço especialmente à Prof^a Dr^a Beatriz Medeiros que, tanto nos cursos de Imunologia quanto no de Vacinas, contribuiu muito para minha formação e na conclusão da dissertação, por meio do exame de qualificação, veio acrescentar mudanças e sugestões que muito colaboraram.

À Prof^a Dr^a Virgínia Paes Leme Ferriani, que desde minha formação acadêmica, e agora de pesquisador, tem se mostrado um farol de ensino, pesquisa e acima de tudo uma grande amiga.

À Prof^a Dr^a Cleni M.M. Machado pelo apoio e sugestões na banca da defesa .

À Prof^a Dr^a Iracilda Zeppone Carlos, valoroso exemplo de pesquisadora e uma irmã que estimo e que muito me ajudou.

Agradeço a Patrícia Vianna Bonini Palma do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto-FUNDHERP, que muito colaborou na execução da parte prática da pesquisa.

Pela valorosa ajuda da Ana Paula Munhoz do laboratório de Imunologia que contribuiu na coleta do sangue e na execução da parte laboratorial.

Agradeço às minhas secretárias: Lene e Renata, que colaboraram desde a convocação das crianças até execução do teste de desencadeamento do leite, feito em meu consultório.

Um agradecimento especial à Lene, secretária, amiga e cunhada sempre presente em todos os momentos desta pesquisa realizada.

Agradeço à Eliane pelas vezes que usufruí dos seus momentos de descanso, pedindo sempre o seu auxílio competente.

Agradeço à Letícia minha querida sobrinha, que muito me ajudou e colaborou.

Aos meus pais, Benedito (in memorian) que sempre foi exemplo de batalha em tudo que decidia fazer e minha mãe Maria, com quem aprendi desde os primeiros momentos, como lidar com crianças, inspirado em seu jeito como tratava todas as crianças.

Reservo este espaço, mais que especial, para pessoas que conviveram e sempre estiveram presentes no meu dia-a-dia. À Meire, minha esposa, pelo apoio firme e sempre presente, em todos os momentos. Às duas grandes princesas de minha vida, Gabriela e Lara, minhas filhas queridas, que mesmo com a disputa pelo computador deixaram o papai trabalhar e apoiaram a execução do trabalho até o fim.

A todos, muito obrigado.

SUMÁRIO

Resumo	8
Abstract	9
Introdução	11
Objetivo	19
Material e Métodos	21
Delineamento do estudo e população	22
Definições clínicas	22
Antecedentes alérgicos	23
Teste do desencadeamento aberto	24
Algoritmo do teste	25
Caracterização dos grupos	26
Imunofenotipagem linfocitária	27
Determinação de citocinas séricas	27
Dosagem da IgE total e específicas ao leite de vaca	30
Análise estatística	30
Resultados	31
Perfil clínico da população estudada	32
Expressão de marcadores de superfície celular	34
Perfil sérico das citocinas padrão Th1/ Th2	39
Perfil sérico da IgE total e específicas ao leite de vaca	40
Discussão	41
Conclusões	44
Bibliografia	46
Anexos	53
I - Protocolo de pesquisa	54
II - Termo de consentimento	56
III - Termo de doação	59
IV - Tabelas de resultados	60
V - Comitê de ética	68

Resumo

A alergia à proteína do leite de vaca (APLV) é comum no primeiro ano de vida e o seu reconhecimento e diagnóstico são difíceis. A proposta deste estudo é verificar a expressão de fenótipos linfocitários, as citocinas padrão Th1 e Th2, e a IgE total e específica em crianças com APLV, crianças atópicas (AC) e não atópicas (NAC) e suas respectivas mães. Foram colhidas amostras de sangue periférico para tipagem de linfócitos por citometria de fluxo, e dosadas as citocinas séricas, por CBA (Cytometric Bead Array) e dosado a IgE total e específica para as proteínas caseína, α lactoalbumina e β lactoglobulina, das crianças e suas mães nos grupos APLV, AC e NAC. Nas crianças do grupo APLV o início dos sintomas foi por volta dos 5,1 meses de idade, com idade média de 17,25 meses (sd=14,8 meses). As crianças e suas mães dos grupos alérgicos (APLV e AC) mostraram maior número de linfócitos CD4+CD25+ ($p < 0,05$) em relação àquelas do grupo não alérgico (NAC), mas sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos APLV e AC. O grupo APLV mostrou maior tendência à presença do fenótipo CD25. As concentrações séricas das citocinas IL4, IL5, IL10, IL2, TNF- α e IFN- γ , entre os grupos estudados, não apresentaram diferenças estatísticas significantes ($p > 0,05$), porém houve uma maior tendência à expressão da IL10 nas crianças do grupo APLV. A IgE total ficou mais evidente no grupo APLV do que nos demais grupos, e os principais alérgenos foram a α -lactoalbumina e β lactoglobulina. As crianças com alergia ao leite de vaca apresentam uma maior positividade de linfócitos CD4+CD25+, presença de IgE total e expressão de IL10 *in vivo* o que também pode sugerir um meio de controle da alergia para desenvolver tolerância à proteína do leite de vaca.

Abstract

The allergy to cow's milk protein (CMA) is common in the first year of life and it is difficult to acknowledge and diagnose it. This study aims to verify the expression of lymphocyte phenotypes, detect the TH2 and TH1 pattern cytokines and the total and specific IgE in CMA children, in atopic (AC) and non-atopic (NAC) children and their respective mothers. Samples of peripheral blood were collected in order to type the lymphocytes by flow cytometry, dosed the serial cytokines by Cytometric Bead Array (CBA) and dosed the total IgE and specific IgE for the casein, α lactoalbumin and β lactoglobulin proteins of the children and their mothers in the CMA, AC and NAC groups. In the CMA children the symptoms first occurred around 5,1 months old, with the average age of 17.25 months (sd=14.8 months). The children and their mothers from the allergic group (CMA and AC) showed significantly presence of CD4+CD25+ lymphocytes ($p<0.05$) higher than the non-allergic group (NAC), but without any significant difference ($p>0.05$) between the CMA and AC groups, although there was a tendency to an increase presence of these cells in the CMA group. The serial concentration of the IL4, IL5, IL10, IL2, TNF- α and IFN- γ cytokines, among the studied groups, did not present significant statistical difference ($p>0.05$), however, there was a tendency to an increase expression of IL10 in the CMA group of children. The total IgE was more evident in the CMA group than in the other ones and the main proteins which caused allergic reactions were α -lactoalbumin e β lactoglobulin. The children with cow's milk allergy presented a higher positivity of CD4+CD25+ lymphocytes, higher total IgE and an increase expression of *in vivo* IL10, which may also suggest a means of control of the allergy to develop tolerance to the cow's milk proteins.

Lista de Abreviaturas

Grupo APLV: crianças com alergia a proteína do leite de vaca.

Grupo AC: crianças atópicas, mas não alérgicas a proteína do leite de vaca.

Grupo NAC: crianças não atópicas.

Lista de Figuras

Figura 1: Algoritmo do Desencadeamento Aberto ao leite de vaca

Figura 2: Curva-padrão das Citocinas

Figura 3: Citometria de fluxo de uma criança do grupo APLV

Figura 4: Citometria de fluxo de uma criança do grupo AC

Figura 5: Citometria de fluxo de uma criança do grupo NAC

Lista de Tabelas

Tabela 1: Caracterização dos grupos

Tabela 2: Distribuição dos grupos, faixas etárias

Tabela 3: Sintomas e sinais presentes nas crianças com APLV

Tabela 4: Teste do desencadeamento aberto ao leite de vaca

Tabela 5: Fenotipagem dos linfócitos

Tabela 6: Padrão das citocinas séricas

Tabela 7: IgE total e específica às proteínas do leite de vaca .

INTRODUÇÃO

Introdução

A doença atópica representa um importante problema de saúde nos países industrializados, onde a prevalência em crianças tem aumentado nos últimos 30 anos (2).

A atopia, com ou sem sintomas clínicos, é o fator de risco mais importante no desencadeamento da asma. O termo atopia vem do grego *atopos* que significa estranho e foi introduzido por A.F. Coca e R Cooke (3) em 1923, para descrever doenças alérgicas. A atopia é uma predisposição genética de certos indivíduos para a síntese inapropriada de IgE específica para componentes protéicos de alérgenos ambientais. Estudos recentes sugerem que a atopia esteja ligada a determinadas regiões de cromossomos, particularmente 11q e 5q (4-7). O risco de desenvolver asma é 10-20 vezes maior em atópicos do que em não-atópicos. A atopia pode ser determinada, por meio de testes cutâneos (punctura, escarificação e intradérmico), pela IgE específica (RAST) para alérgenos comuns e pela dosagem da IgE sérica total (8). A elevação da IgE não é um atributo somente da atopia, sendo encontrada em outras patologias como nas doenças parasitárias (9), no mieloma (10), nas doenças inflamatórias crônicas intestinais (11), na infecção pelo vírus do HIV (12), ou em doenças raras como a síndrome de Job (13). A atopia é muito comum e sua prevalência em adultos jovens com testes cutâneos positivos para a poeira doméstica ou pólenes varia entre 40 e 50% (14,15). Como resultado da alta prevalência, 1/5 dos casamentos pode ocorrer entre dois atópicos, e uma parcela considerável da população terá dois ou mais genes que predispõem a atopia. A propensão individual para atopia e asma é geneticamente determinada, porém as grandes variações regionais são decorrentes de fatores ambientais.

Na infância os sintomas atópicos mais comuns são: dermatite atópica, alterações gastrointestinais, chiado recorrente, asma brônquica e rinoconjuntivite alérgica (16).

Reações adversas aos alimentos, como proteína do leite de vaca, são mais comuns no primeiro ano de vida, e alergia para inalantes ocorre mais tardiamente (16,17 e18). A prevalência cumulativa de diferentes doenças alérgicas demonstra que os anticorpos da classe de imunoglobulina E (IgE) participam como importantes mediadores nestas doenças (19), sendo:

- Alergia alimentar: prevalência de 7-8% , mediado por IgE em 40-60%;
- Dermatite atópica: prevalência de 15 –20% , mediado por IgE em 20- 70%;
- Asma e chiado recorrente em menores de 5 anos: prevalência 31- 34%, mediado por IgE em 30- 50%;

- Asma em maiores de 5 anos: prevalência 7- 10 %, mediado por IgE em 60 – 90%.

A doença alérgica precoce em crianças, mediada por IgE, está associada ao aumento do risco de doença alérgica severa futuramente. Desta forma, no curso natural da doença alérgica, chamada marcha alérgica, é muito importante considerar os fatores que diretamente influenciam sua expressão. Neste caso, o desenvolvimento com expressão fenotípica de doença alérgica depende de uma complexa interação entre fatores ambientais e genéticos. Até o presente momento estima-se que fatores genéticos são responsáveis por 50% das manifestações de asma alérgica. Torna-se evidente que fatores ambientais são importantes no processo de sensibilização, no caso das doenças alérgicas, e que diferentes fatores ambientais podem contribuir para o aumento da prevalência dessas doenças (20).

As doenças alérgicas são complexas e multifatoriais. Seu aparecimento e expressão clínica dependem da interação entre fatores genéticos e ambientais (21). Estima-se que os fatores genéticos exerçam papel fundamental na expressão da doença alérgica (21-24). Embora não haja, no momento, testes genéticos disponíveis para identificar indivíduos com risco de alergia alimentar, a história familiar de atopia, incluindo alergia alimentar, ainda é o melhor indicativo de risco para o seu aparecimento (23,25-26).

Na atopia, tem-se mostrado que 30% dos recém-nascidos têm um pai com doença alérgica ou irmã ou irmão anterior; ou 5% dos recém-nascidos têm ambos os pais com hereditariedade atópica; 10% têm um irmão ou irmã e um pai com atopia; e, 60-65% não apresentam relação hereditária atópica (27,28).

Em relação aos fatores relacionados à dieta, a amamentação durante pelo menos 6 meses, exclusivamente, esteve associada com a redução de eczema e alergia alimentar, além de apresentar menor escore para alergia respiratória. A amamentação tem sido apontada como um fator que reduz o risco de chiado durante a infância (29). Estudos reportam o benefício da amamentação quando esta é prolongada (maior que 4-6 meses) e introdução de alimentos sólidos tardios (após 4-6 meses).

No leite materno há uma complexidade imunológica (30,31). Por exemplo, a IgA secretora (s-IgA) que é transferida da mãe para a criança: baixos níveis de s-IgA têm sido associados com aumento do risco de alergia ao leite de vaca. As citocinas: IL-4, IL-5 e IL-13, que são as mais intimamente envolvidas na produção de IgE e indução de eosinófilos estão em altas concentrações no leite materno de mães atópicas. O TGF- β (Fator de Crescimento e Transformação do tipo beta), predominante no leite humano, aumenta a capacidade da criança de produzir IgA contra β -lactoglobulina, caseína, gliadina e ovalbumina (32,33). A presença de células com fenótipo CD14 presentes no leite materno em altas concentrações, induzem a uma

resposta Th1(34). A composição de ácidos gordurosos polinsaturados e poliaminas parece afetar a alergenicidade versus imunoproteção do leite materno (35). Altos níveis de proteína catiônica eosinofílica têm sido associados com aumento da incidência de alergia ao leite de vaca e dermatite atópica (36).

O leite materno é o ideal para nutrição do lactente, a AAP (Academia Americana de Pediatria) (37), ESPACI (Sociedade Européia de Alergologia e Imunologia Clínica) e ESPGHAN (Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição), recomendam leite materno como parte da prevenção da sensibilização a alérgenos (38).

A alergia alimentar ou suspeita é um problema comum em pediatria e estima-se que 30% das crianças têm sintomas relacionados aos alimentos (39).

Os mais importantes relatos de alimentos alergênicos em crianças são: leite de vaca, ovo de galinha, amendoim, peixe, frutos do mar, soja, trigo e aditivos (40). Estudos mostram a prevalência estimada da alergia ao leite de vaca em 1,1 a 2,5%; ovo de galinha 0,6 a 1,6% e amendoim 0,4 a 1,5%.

A alergia à proteína do leite de vaca (APLV) é definida como uma reação adversa mediada imunologicamente contra antígenos do leite de vaca (41). É o primeiro fenômeno da sintomatologia atópica e da “marcha atópica”, porque as proteínas do leite de vaca são as primeiras consumidas em grande quantidade por uma criança. Sintomas da APLV comumente aparecem durante o primeiro ano de vida e após dias ou semanas com alimentação com fórmulas baseadas no leite de vaca, ou em sua primeira exposição. A incidência de APLV em crianças durante exclusiva amamentação é relatada em 0,4 a 0,5%(42). Os sintomas de APLV mais freqüentemente envolvem a pele, o trato gastrointestinal e o respiratório (43).

O diagnóstico de APLV é baseado numa história clínica e numa definitiva ausência de sintomas após eliminação do leite de vaca da dieta da criança e da mãe que amamenta, e a sinalização de recorrência de sintomas idênticos durante a reintrodução do leite de vaca.

Uma das formas de se diagnosticar a ALPV é por meio do teste padrão duplo-cego controlado por placebo, que é considerado como padrão-ouro no diagnóstico de alergia alimentar, no entanto, é de difícil execução (44, 45, 46).

Segundo E. Isolauri (47,48), no protocolo de desencadeamento duplo-cego controlado por placebo, a fórmula utilizada como placebo é constituída por um composto de aminoácidos sintéticos (Neocate ®) e a fórmula-teste é preparada pela adição de leite de vaca desnatado ao composto de aminoácidos (Neocate ®). O placebo e a fórmula com leite de vaca devem ter aspecto e odor semelhantes. Uma seqüência de randomização computadorizada deve ser criada para que não se permita que os membros da equipe e pais dos pacientes reconheçam

qual fórmula está sendo utilizada. No primeiro dia do desencadeamento, doses crescentes de placebo ou fórmula-teste devem ser administradas por via oral (1ml, 5ml, 10ml, 50ml e 100ml), com intervalos aproximados de 30 minutos. Este esquema pode ser modificado, na dependência do grau da hipersensibilidade ao leite de vaca por lactentes jovens, que pode resultar em choque anafilático. O período de teste, tanto para o placebo quanto para a fórmula com leite de vaca, deve ser de uma semana, permitindo que se identifiquem reações alérgicas tardias e evitando a necessidade de repetição do teste de desencadeamento e de novos períodos de dietas de exclusão. A utilização da fórmula de aminoácidos por uma semana funciona, na prática, como um período de exclusão. Este período, no qual não há exposição a qualquer proteína heteróloga, pode prestar-se tanto para o diagnóstico quanto para o início do tratamento. O desencadeamento é iniciado no hospital e, se não ocorrem reações nas primeiras horas após a ingestão de volumes adequados para a idade, o procedimento pode ser continuado no domicílio do paciente. Durante sete dias devem ser registradas todas as manifestações que o paciente apresentar (erupções cutâneas, pruridos, vômitos, irritabilidade, sintomas respiratórios e características das fezes). Os pacientes devem ser reavaliados pelo médico se surgirem reações adversas. Confirmado o reaparecimento das manifestações de alergia, o teste de desencadeamento deve ser interrompido. O intervalo em relação ao início do aparecimento da manifestação, o tipo de reação e a quantidade de fórmula ou placebo recebida devem ser registrados. A alergia à proteína do leite de vaca é definida como a ocorrência de uma reação adversa inequívoca durante o teste de desencadeamento. Pacientes com desencadeamento negativo devem continuar recebendo a fórmula de leite de vaca de forma aberta, para detecção de eventuais resultados falso-negativos durante o desencadeamento duplo-cego controlado por placebo. Pacientes com alergia às proteínas do leite de vaca devem ser submetidos a desencadeamento novamente em intervalos de 6 a 12 meses, para determinar se desenvolveram tolerância à proteína heteróloga, evitando-se a manutenção de dieta restritiva desnecessariamente. A fórmula de aminoácidos é escolhida para o desencadeamento por sua provada característica de não gerar reações alérgicas. As fórmulas com proteínas extensivamente hidrolisadas podem ser utilizadas, mas reações adversas alérgicas a esses produtos têm sido descritas.

Sendo assim, uma outra opção mais acessível, é o teste do desencadeamento aberto com leite de vaca (49, 51,52), cujos sintomas podem ser causados por pequenas doses como 5ml a 10ml do leite de vaca. O teste do desencadeamento aberto com leite de vaca, segundo o protocolo da Sociedade de Gastroenterologia (49), é recomendado para o diagnóstico de APLV em lactentes (conforme relatado pela ESPGHAN, 1992) (50).

Segundo E. Isolauri (47,48) o protocolo de desencadeamento aberto com leite de vaca, tanto o médico como os pais têm conhecimento de que a fórmula utilizada na alimentação contém proteína do leite de vaca. O teste deve ser iniciado sob supervisão médica e se estender no período de uma semana a 30 dias. O teste do desencadeamento só deverá ser realizado após algumas semanas de dieta de exclusão, tempo necessário para que ocorra uma normalização das alterações morfológicas e funcionais do trato digestório, resolução do quadro clínico e consistente melhora do estado nutricional. Geralmente, isto ocorre entre 6-8 semanas. O médico umedece uma gaze com uma fórmula láctea modificada derivada do leite de vaca e encosta na pele do paciente, para verificar se ocorre uma reação imediata cutânea eritematosa pelo contato. O mesmo procedimento pode ser feito na mucosa oral, com o objetivo de verificar se ocorre o aparecimento de edema labial. Se o paciente permanecer assintomático, pode ingerir cerca de 10ml da fórmula, e, a seguir, aumentar o volume administrado a cada 20 minutos, até completar 1 ou 2 horas. Caso o paciente permaneça assintomático, sem lesões cutâneas, vômitos, diarreia e manifestações respiratórias, o teste de desencadeamento pode ser continuado no domicílio do paciente, e os volumes de fórmula láctea devem ser aumentados progressivamente, até a quantidade normalmente consumida diariamente. Os pais deverão anotar qualquer manifestação que a criança apresente. Os pacientes que não apresentarem manifestações clínicas compatíveis com alergia alimentar devem ter agendadas reavaliações entre 7 e 30 dias após início do desencadeamento. Se não ocorrerem sintomas neste período, o teste é considerado negativo. Se em contrapartida, houver alguma reação adversa, o paciente deve ser reavaliado pelo médico e o teste deve ser interrompido, fato que confirma o teste do desencadeamento positivo.

Quando se trata de APLV temos a imunoglobulina E mediando alergia que ocorre em torno de 60% e hipersensibilidade não IgE em 40% nas reações adversas ao leite(53) e a maioria das reações mediadas por IgE envolve a pele e nas não IgE o trato gastrointestinal. Envolvimento central da IgE na reação aos alimentos tem sido descrito. As proteínas do leite têm sido bem caracterizadas e divididas: α caseína, β caseína, κ caseína, α lactalbumina, e β lactoglobulina(54). No grupo mediado por IgE, há uma significativa correlação entre os níveis de IgE e os níveis das outras imunoglobulinas isotipos de todas as proteínas do leite. Há tendência de indivíduos com altos níveis de IgE – específico ao leite com altos níveis de IgA, IgG1 e IgG4 específicos ao leite como uma resposta imunoglobulina poliisotípica . Achou-se que caseína foi o alérgeno predominante na APLV em reações IgE-mediadas. Nos pacientes com reações não IgE-mediada da APLV temos doenças tais como a hipersensibilidade gastrointestinal, síndrome enterocolite induzida por leite de vaca e gastroenterite eosinofílica alérgica, cujo diagnóstico é

confirmado por biópsia, com infiltrado de eosinófilos na mucosa gástrica ou intestinal. Nestes pacientes com síndrome gastrointestinal, temos a caseína com predominante antigênico (53).

Relacionando a atopia e a IgE utiliza-se uma combinação do Patch teste para atopia e Prick teste da pele, quando combinados dão uma sensibilidade de 100% e valor preditivo negativo de 100%, mas especificidade de 50% e valor preditivo positivo de 76%(55). Nas crianças com APLV, o sistema Unicap tem sensibilidade de 91% e especificidade de 74%(56).

As células T específicas a antígenos alimentares são importantes na etiologia das reações alérgicas a alimentos, sendo a liberação de citocinas padrão Th2 (IL4,IL5 e IL13) as envolvidas. O CD25 é um importante marcador da ativação das células T, o CD30 está associado preferencialmente com produção de citocinas Th2 e a expressão de CD26 está associada com a resposta Th1. Há correlação na expressão de CD26 e IFN- γ e entre CD30 e IL4 (57).

O aumento da produção de IL4 e decréscimo de IFN- γ nas doenças atópicas têm sido demonstrados em vários estudos (58). Nos pacientes com APLV há uma diferença na frequência de marcadores CD4+, mas não nos marcadores CD8+, que são em número baixo nesses pacientes. IFN- γ e TNF- α são citocinas necessárias para adequada comunicação celular do neonato e ambas têm importante envolvimento na ativação de células apresentadoras de antígenos, nas células T e na tolerância oral contra antígenos alimentares. Há estudos mostrando que atópicos e nos com APLV têm redução de IFN- γ e TNF- α .

Um aumento significativo na secreção de TNF- α foi observado em pacientes com exclusão da proteína do leite de vaca (59).

Há indicações que na regulação da resposta imune durante a indução da tolerância, a IL10 e TGF- β ou ambas têm papel importante (60). Crianças com APLV persistente são padrões Th2 e a produção de IL4 e IL13 está correlacionada com a expressão do marcador CD25. Os pacientes alérgicos, mas não com APLV, apresentam alta produção de IL10 a qual está positiva e correlacionada com a produção de IL4 e IFN- γ com expressão de CD25. Já pacientes não alérgicos, não produzem altos níveis de citocinas e não expressam este marcador celular. Concluiu-se que células T CD4+ ativadas com alta expressão de CD25 podem contribuir para a resposta imune tolerogênica contra um antígeno, por meio da produção de IL10.

A tolerância à proteína do leite de vaca foi associada com aparecimento na circulação de células T regulatórias CD4+CD25+ (T reg) capazes de suprimir as células T efetoras na reintrodução do leite de vaca (61).

Bactérias probióticas são propostas para aliviar a inflamação intestinal em crianças com alergia alimentar e síndrome dermatite/eczema atópica (62,63). *Lactobacillus GG* tem efeito no aumento da produção de IFN- γ em crianças com APLV (64).

O reconhecimento da APLV e seu diagnóstico são difíceis, uma vez que não há um exame único ou combinação de exames que definam esse diagnóstico. Desta forma, o estudo do perfil alérgico em crianças, no primeiro ano de vida, deverá contribuir para as decisões clínicas quanto ao controle precoce e redução destas manifestações.

Atualmente, tem sido sugerido um protocolo para diagnóstico e tratamento da APLV em lactentes (49), no entanto, muito pouco se conhece sobre os mecanismos imunológicos envolvidos nesta alergia ou associados ao curso do tratamento. Assim, se faz necessário o desenvolvimento de pesquisas com o intuito de evidenciar não somente as reações imunológicas no lactente, mas também as relações parentais e com outras doenças atópicas.

OBJETIVO

Objetivo

Estudo do perfil alérgico à proteína do leite de vaca (APLV) em crianças e suas respectivas mães, por meio de avaliação clínica e teste de desencadeamento aberto conforme protocolo ESPGHAN; pesquisa de anticorpos IgE total e específicos para caseína α lactoalbumina e β lactoglobulina; alterações de citocinas plasmáticas IL4, IL5, IL10, IL2, TNF- α e IFN- γ ; e, expressão do fenótipo CD25 em células CD3+CD4+.

MATERIAL E MÉTODOS

Material e Métodos

Delineamento do estudo e população

Os pacientes com suspeita de APLV foram convocados no período de abril a novembro de 2007, junto às creches e consultórios de pediatras do município de Araraquara. Estes pacientes foram encaminhados para avaliação clínica diagnóstica de APLV e preencheram o protocolo de pesquisa, os termos de consentimento e de doação, em anexo. Foram colhidas informações pelo pesquisador sobre a história da queixa atual e manifestações clínicas como o início dos sintomas, a sua duração, o ganho de peso adequado, as náuseas e vômitos, a doença do refluxo gastroesofágico, a diarreia, a dermatite atópica, a urticária aguda, a rinite alérgica, o broncoespasmo (chiado), a síndrome de alergia oral, a anafilaxia gastrointestinal e as evacuações com estrias de sangue, sempre relatados pela mãe ou responsável.

Considerou-se importante colher informações a respeito da relação entre a introdução do leite de vaca e seus sintomas, sua melhora no processo com exclusão do leite de vaca e derivados e, por fim, qual leite foi introduzido.

Definições Clínicas

Atopia: presença de manifestações clínicas sugestivas de reações alérgicas, em decorrência de sensibilização alérgica, tais como: rinite alérgica, asma, dermatite atópica, urticária, alergia alimentar.

Ganho de peso adequado: apresentação de déficit de ganho de peso em decorrência da APLV, diagnosticado por médico que segue o paciente de rotina, conforme relato da mãe ou responsável, em relação às curvas de normalidade.

Rinite alérgica: presença de sintomas tais como espirros, prurido nasal, coriza ou obstrução nasal, não relacionados a episódios de infecção viral de vias aéreas superiores.

Provável asma (chiado): presença de chiado persistente, maior que 30 dias associado à sensibilização alérgica, diagnosticado por médico que segue o paciente de rotina.

Doença do refluxo gastroesofágico (RGE): diagnóstico de refluxo relatado pela mãe ou responsável, diagnosticado por médico que segue o paciente de rotina, com sintomas tais como inapetência, recusa alimentar, náuseas, vômitos e dores abdominais.

Urticária Aguda: quadro de prurido e placas eritematopapulares de caráter migratório minutos ou horas após a ingestão da proteína do leite de vaca, relatado pela mãe ou responsável.

Síndrome da alergia oral: reação de caráter imediato, com edema dos lábios, intumescimento da língua, prurido e inchaço palpebral.

Sangue nas fezes: sangue macroscópico relatado pela mãe ou responsável.

Antecedentes alérgicos

História pessoal de alergia: relato de asma, rinite alérgica, dermatite atópica, urticária, diarreia e vômitos, diagnosticados por médico.

História familiar de alergia: relato de asma, rinite alérgica, dermatite atópica, urticária, diarreia, e vômitos, diagnosticados por médico em pai, mãe e/ou irmão(s).

Exame físico do paciente.

Teste do Desencadeamento Aberto.

Os pacientes com suspeita de APLV realizaram o Teste de Desencadeamento Aberto com leite de vaca no consultório do pesquisador. Esse teste, conforme protocolo da Sociedade de Gastroenterologia (49), é recomendado para o diagnóstico de APLV em lactentes (conforme relatado pela ESPGHAN, 1992) (47, 48, 50), e apresenta as seguintes fases:

1. Eliminação de produtos do leite e derivados, da dieta, por 6-8 semanas, com boa evolução clínica.
2. Aplicação com gaze umedecida em fórmula láctea sobre a pele e mucosa oral, com observação de reação cutânea ou edema labial, confirmando o teste do desencadeamento positivo, imediato.
3. Ingestão oral de 10ml de fórmula láctea e aumento do volume a cada 20 minutos por 2 horas; caso apresente sintomas, o teste é considerado positivo imediato.
4. Se após as 2 horas, o paciente for assintomático continua o teste em casa até se tomar o volume normalmente consumido, e observar se há manifestações em 7-30 dias, teste do desencadeamento negativo, mas se tiver reações e ou sintomas o teste é considerado positivo tardio.

Algoritmo do Teste de Desencadeamento Aberto

A Figura 1 apresenta um esboço do algoritmo do teste do desencadeamento aberto ao leite de vaca, segundo o guia de diagnóstico e tratamento da alergia à proteína do leite de vaca da Sociedade de Gastroenterologia Pediátrica (47) (Vieira et al., 2006)

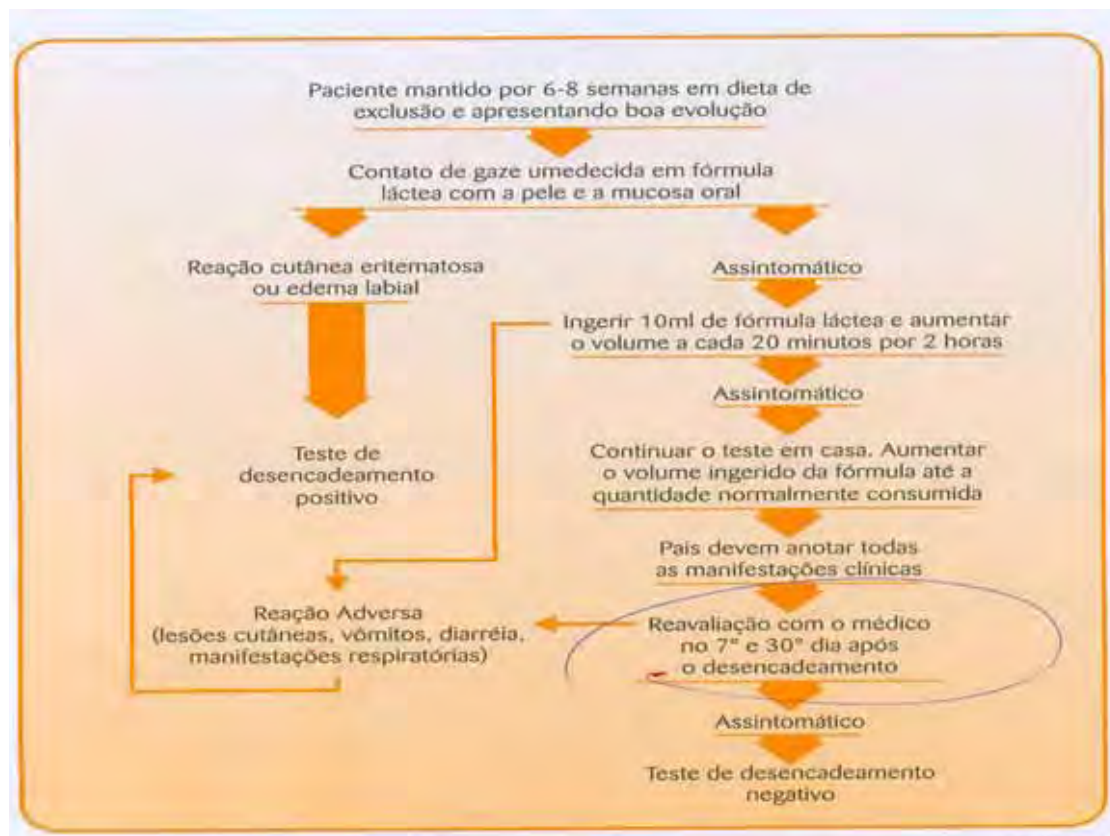


Figura 1 – Algoritmo do Desencadeamento Aberto com Leite de Vaca(47) (extraído do Guia de Dagnóstico e Tratamento da Alergia à Proteína do Leite de Vaca (VIEIRA et al., 2006.)

Caracterização dos grupos

Tais informações possibilitaram a formação de seis grupos: três grupos formados por crianças e três grupos pelas suas respectivas mães (Tabela 1). O paciente atópico é aquele que apresenta manifestações clínicas sugestivas de reações alérgicas, em decorrência de sensibilização alérgica, tais como: rinite alérgica, asma, dermatite atópica, urticária, alergia alimentar.

Tabela 1 – Caracterização dos grupos

GRUPO APLV	Pacientes atópicos e alérgicos ao leite de vaca	Mães de pacientes atópicos e alérgicos ao leite de vaca
GRUPO AC	Pacientes atópicos e não alérgicos ao leite de vaca	Mães de pacientes atópicos e não alérgicos ao leite de vaca
GRUPO NAC	Pacientes sem atopia	Mães de pacientes sem atopia

Foram colhidas amostras de sangue periférico dos seis grupos, em dois volumes de 3,0 mL, com *scalp* e seringa de 10 ml, sendo que uma amostra foi transferida para tubo pediátrico contendo anti-coagulante EDTA e outra para tubo sem EDTA. As coletas foram realizadas pela equipe do Laboratório de Imunologia Clínica.

As amostras dirigidas à tipagem de linfócitos foram analisadas imediatamente, junto ao Hemocentro de Ribeirão Preto, setor de Citometria de Fluxo. A separação do soro foi realizada por meio de centrifugação a 400 g durante 15 minutos. As amostras de plasma foram armazenadas em tubos eppendorf esterilizados e devidamente identificados com as iniciais e código laboratorial de cada paciente, sendo mantidos em freezer a -20°C até o momento de uso.

Imunofenotipagem linfocitária

A tipagem de linfócitos T segue os procedimentos padronizados para a detecção dos linfócitos T CD3/CD4, CD3/CD8 e CD4/CD25, por meio do método de Citometria de Fluxo no sistema BD FACSCalibur (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, Califórnia-USA).

Para a realização da técnica foram usados anticorpos monoclonais específicos ligados aos seguintes fluorocromos: CD4 – FITC (Isotiocianato de fluoresceína), CD8 – PE (Ficoeritrina), CD3 – PerCP (Peridinin Chlorophyl Protein) e CD25-PE, e quando colocados na presença de 50µL de sangue total, puderam se identificar as células contendo os marcadores de superfície específicos.

Determinação de Citocinas Séricas

As amostras de soros armazenadas a -20° C foram descongeladas à temperatura ambiente e analisadas quanto à presença das citocinas IL4; IL5; IL10; IL 2; TNF- α e IFN- γ , por citometria de fluxo por partículas ("bead") ligadas com PE padrão, produto da BD Biosciences : " Cytometric Bead Array (CBA)". O procedimento foi realizado conforme descrito no manual de instrução do BD™ Cytometric Bead Array (CBA) for Human Th1/Th2 Cytokine Kit II. Utilizou-se para análise das amostras o Software BD CellQuest™ e formatação e análise subsequente por meio do Software BD™ CBA.

Protocolo CBA

Primeiramente foi realizado o preparo dos padrões de citocinas, em que se reconstituiu um padrão de liofilizados com 200 µL de diluente, sendo em seguida equilibrado por 15 minutos, agitou-se bem e foram feitas diluições seriadas padrões (1:2/ 1:4/ 1:8/ 1:16/ 1:32/ 1:64/ 1:128/ 1:256/ branco). Adicionou-se 900 µL de diluente no tubo padrão e 300 µL de diluente nos outros tubos de diluições seriadas e se transferiu 100 µL das soluções padrão concentradas no tubo padrão, homogeneizando bem e transferindo 300 µL para outro tubo.

No preparo das partículas de captura para análise de citocinas no soro, Obteve-se um número de amostras de 50 tubos, e para a curva padrão 10 tubos (Figura 2), num total de 60 tubos. Agitou-se vigorosamente cada suspensão de partículas antes de misturá-las (vórtex), e misturou-se 220 μL de cada partícula e centrifugou-se a mistura de partículas 200 g por 5 minutos, retirou-se o sobrenadante cuidadosamente, ressuspendeu-se a mistura de partículas (no mesmo volume retirado) com soro padrão tamponado e agitou-se bem (vórtex), depois incubou-se a mistura por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro.

No preparo das amostras utilizou-se soro dos pacientes sem diluição e agitou-se bem a mistura de partículas (vórtex) e adicionou-se 20 μL em cada tubo teste e tubos curva-padrão, e mais 20 μL reagente PE, e acrescentou-se 50 μL das diluições dos padrões nos tubos respectivos e 50 μL do soro dos pacientes nos tubos respectivos, incubou-se por 3 horas à temperatura ambiente no escuro, adicionou-se 1 ml de tampão em cada tubo e centrifugou-se 200 g por 5 minutos, descartou o sobrenadante cuidadosamente, 300 μL de tampão padrão foram adicionados em cada tubo para ressuspender as partículas, a seguir adquiriu-se no citômetro, para fazer a leitura.

No preparo das partículas de calibração, 30 minutos antes de acabar a incubação das amostras, foi feito o dobro do indicado; adicionou-se 100 μL das partículas de calibração (agitou-se no vórtex antes de usar), e adicionou-se nos tubos :Tubo A - somente o tampão; no Tubo B - 100 μL de controle positivo FITC, e no Tubo C - 100 μL de controle PE positivo. Incubou-se 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro, e adicionou-se 800 μL de tampão nos tubos B e C, e 900 μL tampão no tubo A, usaram-se tubos para calibração do citômetro e montou-se a curva padrão das citocinas (Figura 2)

BD Cytometric Bead Array Analysis

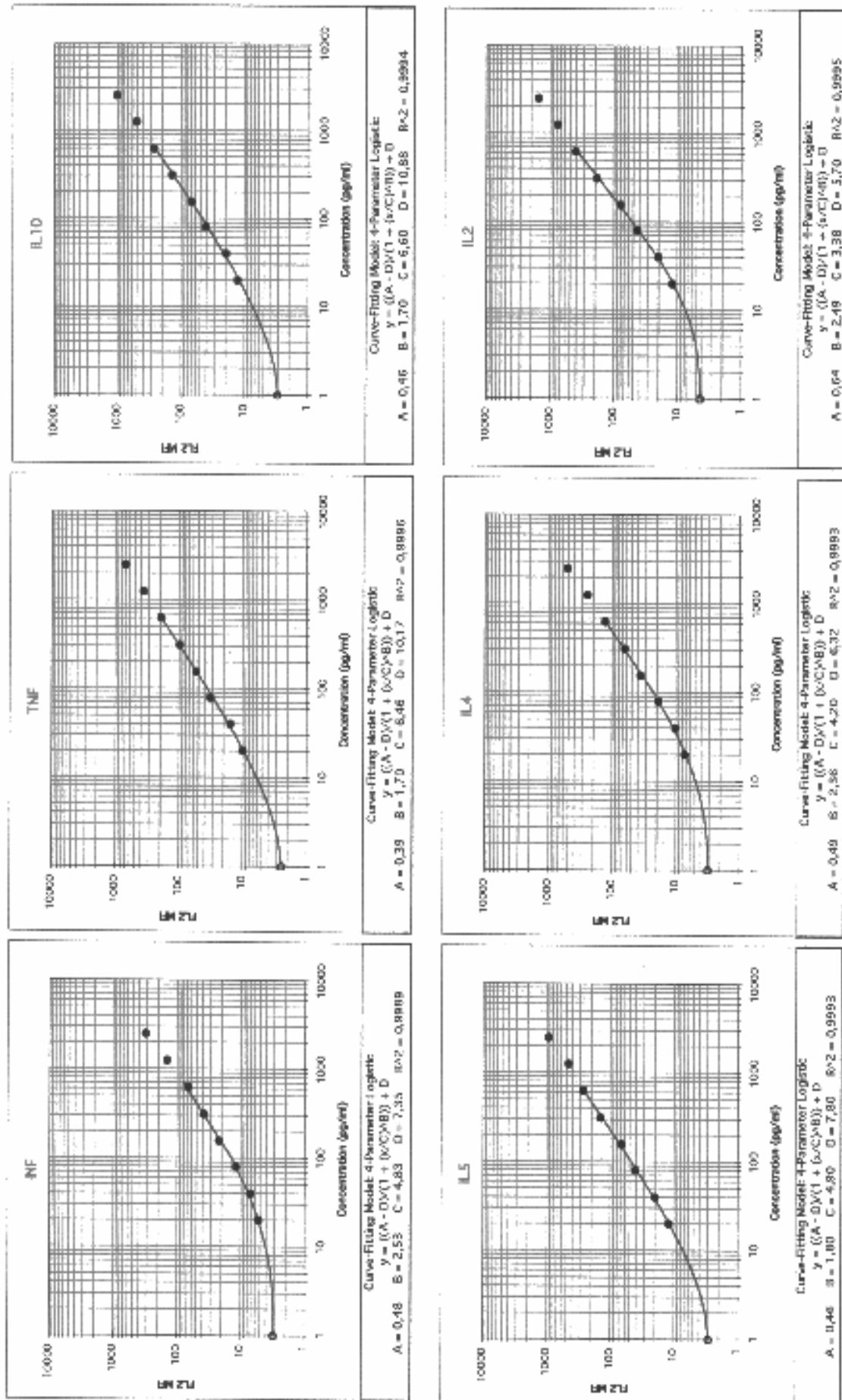


Figura 2 - Curva-padrão com as diferentes diluições para as citocinas.

Determinação do IgE total e IgE específico às proteínas do leite de vaca: caseína, α lactoalbumina, e β lactoglobulina (Método ImmunoCAP™)

As amostras de soros armazenadas a -20° C foram descongeladas à temperatura ambiente e analisadas quanto à presença de IgE total e específica, conforme o manual do IgE específico ImmunoCAP™. O tempo total de um ensaio é de 2,5 horas, as incubações são efetuadas a 37° C pelo aparelho.

O alérgeno de interesse, acoplado covalentemente ao ImmunoCAP reage com a IgE específica da amostra de soro do paciente estudado. Após lavagem das IgE não específicas, adicionam-se anticorpos contra IgE marcados enzimaticamente, para formação de complexos que após incubação a anti-IgE não ligada é lavada, procedendo-se à incubação do complexo ligado com o substrato. Após parar a reação, mede-se a fluorescência do eluído. Quanto mais alto o valor da resposta, maior a presença de IgE específica na amostra. Para avaliar os resultados do ensaio, a resposta das amostras dos pacientes é convertida em concentrações através da utilização de uma curva de calibração.

O software do aparelho ImmunoCAP 100^ε estabelece limites de aceitação para a curva de calibração e para os controles de curva. O aparelho ImmunoCAP 100^ε e o seu software incorporado realizam todos os passos de ensaio e imprimem os resultados automaticamente no final da dosagem. Esses resultados são impressos em **Unidades IgE específicas ImmunoCAP (KU_A/l)**, onde o A representa os anticorpos alérgeno-específicos. Valores de 0,35 KU_A/l e superiores representam um aumento progressivo na concentração relativa de anticorpos alérgeno-específicos. Resultados abaixo de 0,35 KU_A/l representam ausência ou níveis indetectáveis de anticorpos alérgeno-específicos.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, não paramétrico, para determinar a significância das diferenças estatísticas entre os grupos estudados, estabelecendo um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Resultados

Perfil clínico da população estudada

Com os resultados de investigação formaram-se seis grupos sendo três grupos formados por crianças e três grupos pelas suas respectivas mães (Tabela 2):

- Grupo APLV composto por 10 crianças atópicas e alérgicas ao leite de vaca, com idade média de 17,25 meses (sd=14,8 meses, mediana = 16,5 meses) e as respectivas mães;
- Grupo AC composto por 8 crianças atópicas e não alérgicas ao leite de vaca, com idade média de 25,6 meses (sd= 17,4meses; mediana 21 meses) e as respectivas mães;
- Grupo NAC composto por 7 crianças sem atopia, com idade média de 34 meses (sd= 17,8, mediana 44 meses) e as respectivas mães, constituindo o grupo controle.

Tabela 2 – Distribuição dos grupos, faixas etárias.

	Crianças	Mães
GRUPO APLV	10 crianças, idade média= 17,25 meses, mediana =16,5 meses (sd = 14,8meses)	10 mães
GRUPO AC	8 crianças , idade média= 25,6 meses, mediana 21 meses (sd = 17,4 meses)	8 mães
GRUPO NAC	7 crianças , idade média = 34 meses mediana 44 meses (sd = 17,8 meses)	5 mães

As crianças do APLV, com a idade de início dos sintomas de 5,1meses apresentaram os seguintes sintomas: alteração de ganho de peso (50%), náuseas e vômitos (40%), presença de doença do refluxo gastroesofágico (40%), diarreia (40%); dermatite atópica (40%); urticária aguda (40%); rinite alérgica (80%) ; chiado (50%); síndrome oral (10%) e sangue nas fezes (30%) (Tabela3).

Tabela 3 – Sintomas e sinais presentes nas crianças com APLV

	Grupo A
Idade início	5,1 meses
Alterou ganho de peso	50,00%
Náuseas Vômitos	40,00%
Doença RGE	40,00%
Diarréia	40,00%
Dermatite Atópica	40,00%
Urticária Aguda	20,00%
Rinite Alérgica	80,00%
Chiado	50,00%
Síndrome Oral	10,00%
Sangue nas fezes	30,00%

Nas crianças do grupo AC houve a presença de sintomas atópicos gerais, já que elas ingerem o leite de vaca sem sintomas relacionados ao mesmo. Já nas crianças do grupo NAC, temos aquelas que não são atópicas, ou seja, não apresentaram sintomas relacionados à alergia à proteína do leite de vaca.

O teste de desencadeamento no grupo APLV, confirmou positividade imediata em 60% das crianças dentro das primeiras 2 horas, já 40% das crianças mostraram positividade dentro de 7-30 dias, após exposição ao leite de vaca (Tabela 4). Nas demais crianças, dos grupos AC e NAC não foi feito o teste do desencadeamento, pois estas ingeriram o leite de vaca rotineiramente, sem apresentar sintomas. Os antecedentes pessoais e familiares de atopia estiveram presentes em 100% dos grupos APLV e AC, mas não presentes no grupo NAC.

Tabela 4 - Teste do desencadeamento aberto ao leite de vaca.

	Crianças APLV
Introdução do leite de vaca e sintomas	100%
Melhora dos sintomas com exclusão do leite de vaca	100%
Sintomas que persistiram: Rinite alérgica e chiado	67%
Teste do desencadeamento aberto ao leite de vaca imediato (2 horas)	60%
Teste do desencadeamento aberto ao leite de vaca tardio (7-30 dias)	40%

Expressão de marcadores de superfície celular (imunofenotipagem de linfócitos)

Na fenotipagem dos linfócitos sanguíneos observou-se que os linfócitos CD3+CD4+ e CD3+CD8+ tanto para as crianças quanto para as mães não são obtidas diferenças estatísticas entre os grupos ($p>0,05$). Em relação aos fenótipos CD4+CD25+ observaram-se diferenças estatísticas significantes ($p<0,05$) entre os grupos AC e APLV e o grupo NAC. Os linfócitos CD4+CD25+ apresentam maior evidência nas crianças e mães dos grupos APLV e AC, que são os grupos alérgicos, e não aparecem no grupo NAC, grupo controle, e observa-se uma tendência de maior número de linfócitos CD4+CD25+ no grupo alérgico ao leite de vaca para as crianças e não para as mães (Tabela 5).

Tabela 5 – Fenotipagem dos linfócitos nos diferentes grupos de crianças e suas respectivas mães .

Parâmetros	Crianças			Mães*		
	APLV ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	AC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	NAC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	APLV ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	AC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	NAC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Leucócitos	9,45±1,96	9,38 ± 3,36	10,57 ± 2,01	6,86±1,20	7,28 ± 3,00	7,74 ± 1,56
Linfócitos	4,85±1,27	5,00 ± 1,35	6,65± 2,25	2,26±0,54	2,04 ± 0,57	2,52± 0,55
Linf. CD3+CD4+	1,91±1,85	1,99 ± 0,92	2,18± 0,70	0,93± 0,32	0,80 ± 0,26	0,95± 0,17
Linf . CD3+CD8+	0,81±0,34	0,99± 0,41	1,20 ±0,52	0,54± 0,,22	0,48± 0,17	0,68 ±0,19
Linf. CD4+CD25+	0,016± 0,025 ^a	0,007± 0,05 ^a	0,0001 ^b	0,004± 0,05	0,005± 0,008	0,0001

^{a e b} com diferença estatística $p < 0,05$

* Não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados ao nível de 5%.

Uma criança do grupo APLV com 4.5 meses de idade, após contato peri-labial com leite de vaca, apresentou inchaço, vermelhidão (síndrome oral), com contagem dos linfócitos CD4+CD25+ de $0,080 \times 10^3 \text{ cell./}\mu\text{L}$, cinco vezes maior em relação à média do mesmo grupo ($0,016 \pm 0,025 \times 10^3/\mu\text{L}$), mostrando que estas células podem estar envolvidas na mediação do processo alérgico e na alergia às proteínas do leite de vaca (Figura 3).

Uma criança do grupo AC, com idade de 23 meses, que ingere leite de vaca sem sinais e sintomas característicos, com bom ganho de peso, sem lesões de pele, sem vômitos ou diarreia, mas com queixa de rinite alérgica, apresentou uma contagem dos linfócitos CD4+CD25+ de $0,005 \times 10^3 \text{ cell./}\mu\text{L}$, resultado próximo à média do mesmo grupo ($0,007 \pm 0,005 \times 10^3/\mu\text{L}$), mostrando que estas células podem estar presentes no processo alérgico geral (Figura 4).

Em uma criança do grupo NAC, com idade de 44 meses, que ingere leite de vaca sem sinais e sintomas característicos, com bom ganho de peso, sem lesões de pele, sem vômitos ou diarreia, mas sem queixas de rinite alérgica ou atopias, não foram detectados linfócitos CD4+CD25+, mostrando que estas células não aparecem como nos grupos anteriores (Figura 5).

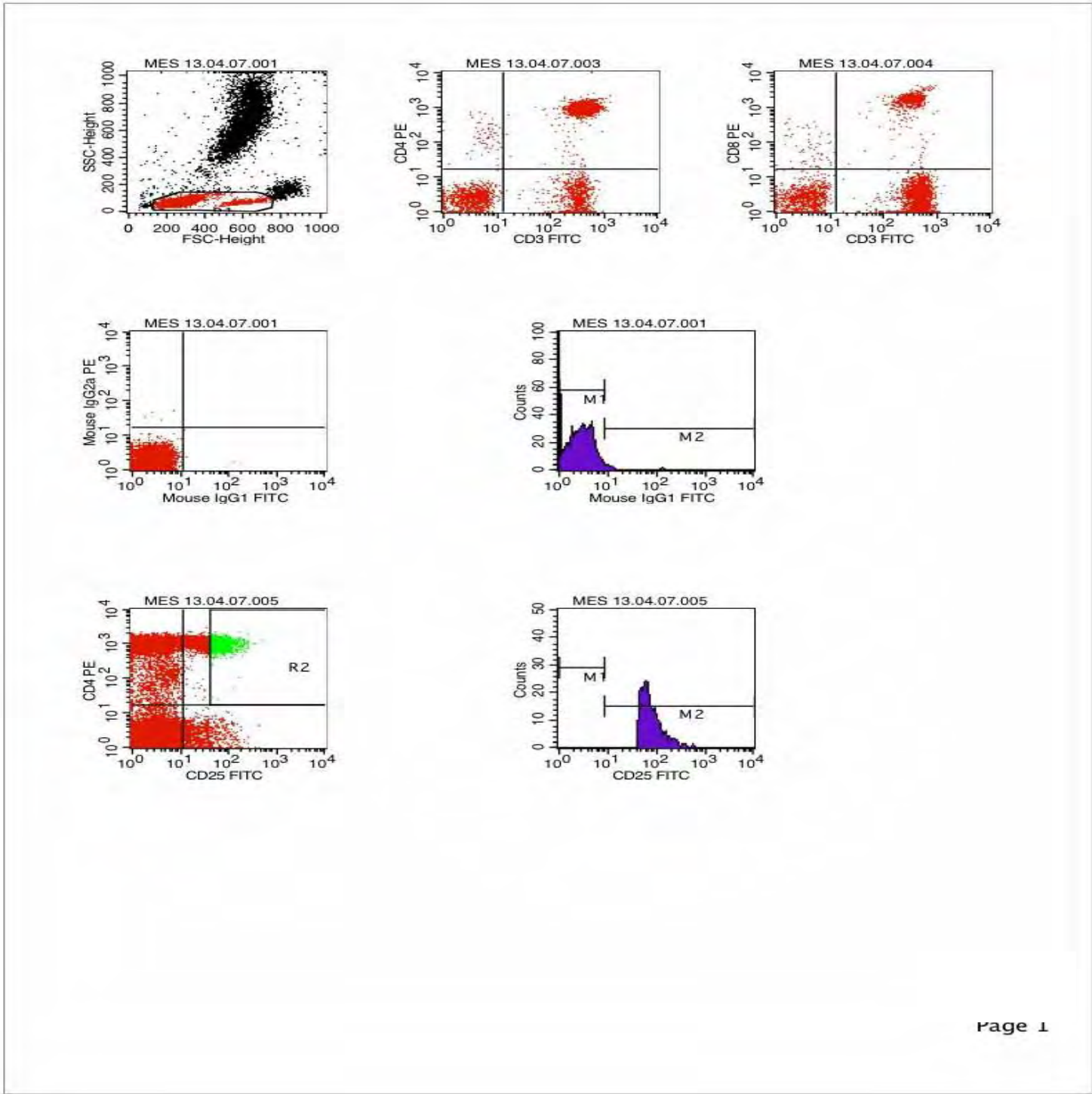


Figura 3 – Análise por citometria de fluxo de subpopulações de linfócitos T. Exemplo de resultado de uma criança do grupo APLV.

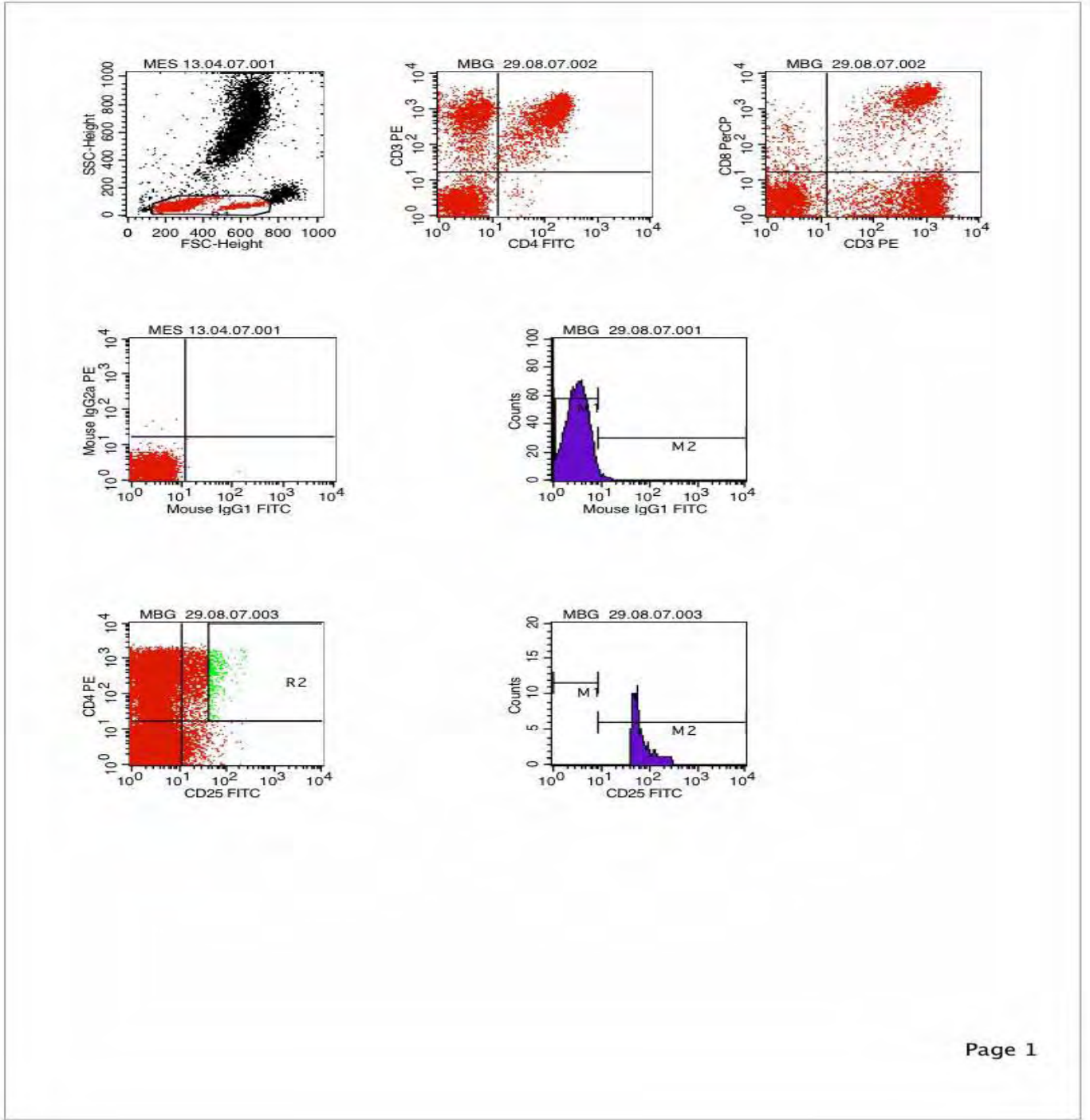


Figura 4 – Análise por citometria de fluxo de subpopulações de linfócitos T. Exemplo de uma criança do grupo AC .

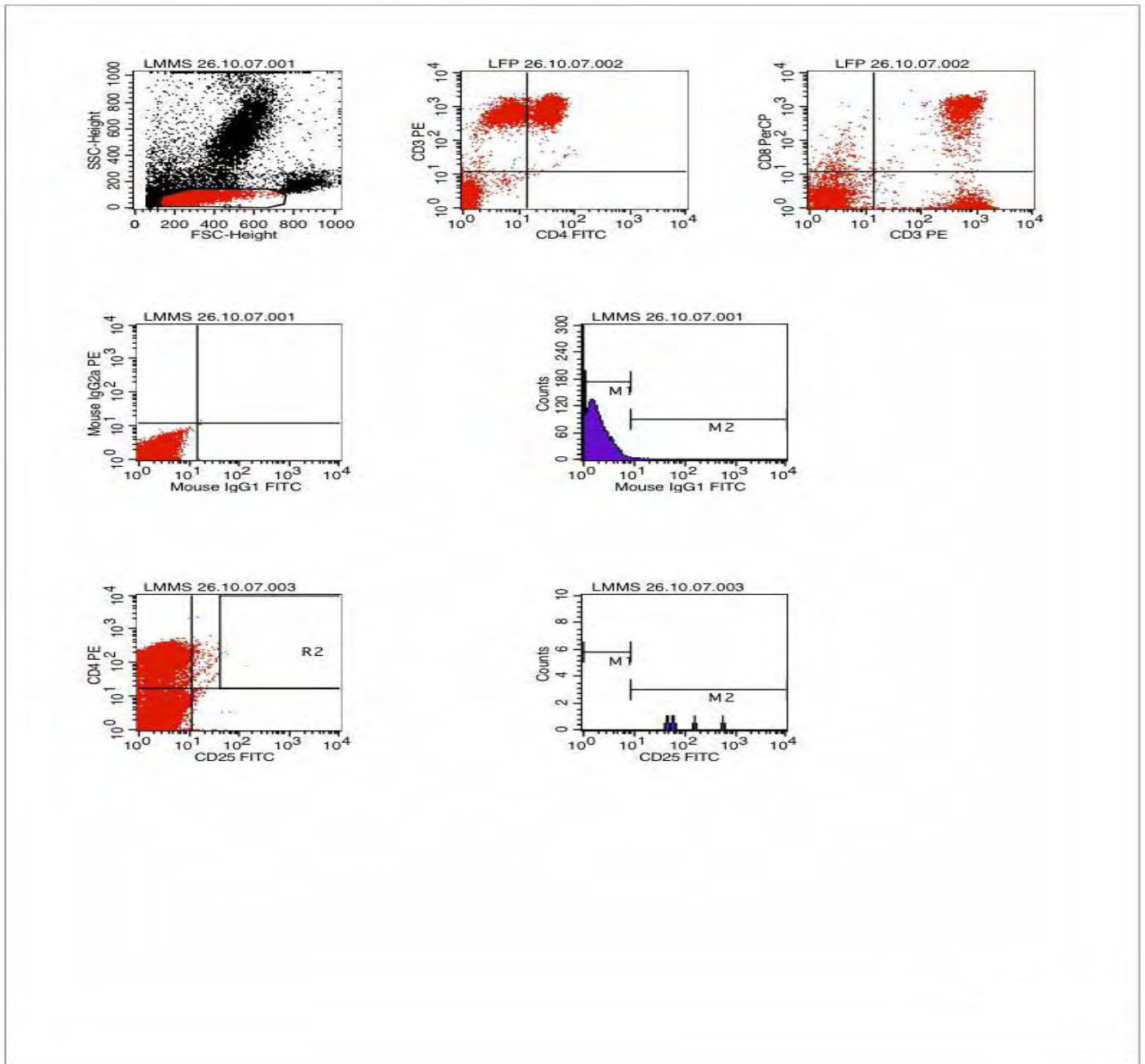


Figura 5 – Análise por citometria de fluxo de subpopulações de linfócitos T. Exemplo de resultado uma criança do grupo NAC.

Perfil sérico das citocinas padrão Th1/Th2

A determinação das citocinas séricas relacionadas aos fenótipos Th1 e Th2, respectivamente, IL -2, TNF- α , INF- γ e IL-4, IL -5, IL -10, pela técnica CBA realizada por citometria de fluxo, entre os grupos estudados, não apresentou diferenças estatísticas significantes ($p>0,05$). Na Tabela 6 são apresentadas as médias com os respectivos desvios-padrão obtidos nos três grupos. Observa-se uma tendência do fenótipo Th2 com secreção de IL-10 ($4,0\pm 4,0$ pg/mL) no grupo APLV, porém não significativa ($p>0,05$), ficando prejudicada a análise de correlação entre os grupos devido às diferenças entre os números de indivíduos participantes deste estudo.

Tabela 6 – Padrão das citocinas séricas nos grupos das crianças e suas respectivas mães

Padrão de regulação	citocinas séricas	Crianças*			Mães*		
		APLV (pg/ml)	AC (pg/ml)	NAC (pg/ml)	APLV (pg/ml)	AC (pg/ml)	NAC (pg/ml)
Th2	IL4	2,2 \pm 2,0	2,5 \pm 2,0	3,3 \pm 0,7	1,9 \pm 1,5	1,9 \pm 1,5	3,9 \pm 0,7
	IL5	1,6	4,5 \pm 2,6	2,8 \pm 0,7	3,0 \pm 1,3	2,9 \pm 1,3	2,9 \pm 1,4
	IL10	5,7 \pm 4,0 4,0 \pm 4,0	2,5 \pm 1,0	2,5 \pm 2,0	1,3 \pm 1,2	1,3 \pm 1,1	2,0 \pm 0,5
Th1	IL2		1,3 \pm 1,9	1,7 \pm 1,3	1,5 \pm 1,6	1,1 \pm 1,2	1,3 \pm 1,2
	TNF α	1,1 \pm 1,0	2,5 \pm 2,8	2,0 \pm 0,5	1,2 \pm 1,1	1,5 \pm 0,7	2,7 \pm 1,1
	INF γ	2,0 \pm 1,3 1,8 \pm 1,6	2,2 \pm 2,8	2,0 \pm 1,4	2,2 \pm 2,5	0,5 \pm 1,3	3,2 \pm 3,9

(*) Não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados ao nível de 5%.

Perfil sérico do IgE total e IgE específico às proteínas do leite de vaca: caseína, α lactoalbumina, e β lactoglobulina (Método ImmunoCAP™)

Na determinação da IgE total houve uma maior presença no grupo APLV, porém não significativa ($p > 0,05$), ficando prejudicada a análise de correlação entre os grupos devido às diferenças entre os números de indivíduos participantes deste estudo. Encontramos uma média de IgE específica positiva para α lactoalbumina e β lactoglobulina (consideram-se positivos os valores $> 0,7$ KU_A/l), sendo que estas IgE específicas não se evidenciaram nos outros grupos, tanto de atópicos, quanto do grupo controle. Aparece caseína com valor fraco, não considerado positivo na literatura em geral.

Tabela 7 – IgE total e específica às proteínas do leite de vaca das crianças e suas respectivas mães

IgE sérico	Crianças			Mães		
	APLV	AC	NAC	APLV	AC	NAC
IgE total UL/ml *	56,1±112,6	13,37±17,0	7,52±5,12	64,9±127,3	37,12 ±51,02	3,12±1,32
Caseína KU_A/l	0,11±0,23	0	0	0	0	0
α lactoalbumina KU_A/l	0,778 ±1,25**	0	0	0	0	0
β lactoglobulina KU_A/l	0,7±1,27**	0	0	0	0	0

* Não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados ao nível de 5%.

**consideram-se valores $\geq 0,7$ KU_A/l como positivo

DISCUSSÃO

Discussão

A alergia às proteínas do leite de vaca (APLV) e os mecanismos efetores relacionados ao seu desencadeamento têm sido alvo de inúmeros estudos. Sabe-se que a função das células T específicas a alimentos na mediação deste fenômeno em crianças alérgicas ao leite difere grandemente na produção de citocinas entre as subpopulações Th1 e Th2.

Sendo assim, em nosso estudo, buscamos avaliar as características de três grupos de crianças e suas respectivas mães conforme a tolerância ou não às proteínas do leite de vaca. A idade de início dos sintomas foi precoce, 5,1 meses de idade, fato que coincide com o momento da retirada do leite materno, uma vez que é consenso que este é o alimento ideal para a nutrição do lactente, segundo recomenda a AAP (Academia Americana de Pediatria), a ESPACI (Sociedade Européia de Alergologia e Imunologia Clínica) e a ESPGHAN (Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição) (16,17).

No grupo de crianças com alergia à proteína do leite de vaca (APLV) observaram-se sinais e sintomas que envolveram a pele, o trato gastrointestinal e o respiratório (41), como se pode observar na Tabela 3, sendo que esses desapareceram com a exclusão do leite de vaca e reapareceram no teste de desencadeamento. A positividade do teste de desencadeamento foi de 60%, imediatamente nas primeiras 2 horas e em 40% aparecem sintomas com 7-30 dias após a reintrodução do leite de vaca (Tabela 4), o que sugere, como relatado na literatura, uma resposta alérgica mediada por IgE que ocorre em torno de 60% e hipersensibilidade não IgE em 40% nas reações adversas ao leite e a maioria das reações mediadas por IgE envolvem a pele e nas não IgE o trato gastrointestinal (53).

Observamos a presença de células CD4+ CD25+ nos grupos alérgicos: APLV e AC das crianças e suas respectivas mães, enquanto que nos não alérgicos não houve detecção destas células, conforme observado na Tabela 5. Uma maior variabilidade no grupo APLV foi constatada em relação à dosagem de linfócitos CD4+ CD25+, pois no mesmo grupo houve vários graus (*atopy status*) de alergia ao leite de vaca, desde quadro leve a quadros mais graves, quadros imediatos e quadros tardios; apesar de não se constatar diferença estatística, notamos que no grupo APLV houve uma tendência a maior positividade das células CD4+CD25+ em relação aos demais grupos para as crianças.

A expressão dos marcadores de superfície CD25, CD30 aumentam nos clones de células T específicas ao leite de vaca e diminui após desenvolver tolerância, evidenciando a importância das células T específicas na patogênese da alergia alimentar e a sua tolerância (57). A tolerância ao leite de vaca é associada ao aparecimento de células T (T reg) CD4+ CD25+ que são capazes de suprimir as células T efetoras na reintrodução do leite de vaca (61). O desenvolvimento de doenças alérgicas como rinite, asma e eczema atópico é controlado por várias populações de células T incluindo T reg CD4+ CD25+ (67). Nas doenças alérgicas a função das células T reg CD4+ CD25+ é dependente da concentração e do tipo de alérgeno respectivo aos diferentes limiares de alergia nos pacientes (68).

Na literatura atual, os estudos mostram que *in vitro* as células T reagem contra antígenos do leite de vaca, e no presente estudo buscamos quantificar as citocinas relacionadas aos fenótipos Th1 e Th2 diretamente no soro. Observamos uma maior tendência de expressão com secreção sérica da IL-10 (Tabela 6), sugerindo um mecanismo dependente de Th2/Th3 na indução da auto-tolerância nas crianças alérgicas ao leite de vaca.

A IgE total ficou mais evidente no grupo APLV, do que nos outros grupos, sugerindo que essas crianças têm seu processo imunopatológico, com envolvimento desse anticorpo, como relatado na literatura nos casos de APLV e sendo um fator de risco para outras atopias (69).

Na literatura há relatos mostrando a caseína como o principal alérgeno da APLV (70), já no nosso estudo ficou mais evidente a α lactoalbumina e β lactoglobulina.

Para finalizar, cabe mencionar que nosso estudo aponta que crianças alérgicas ao leite de vaca apresentam uma maior positividade de linfócitos tipo CD4+CD25+ (Treg), com aumento de IL-10, e com alérgenos como as proteínas α lactoalbumina e β lactoglobulina mais evidentes. Isso pode sugerir novas perspectivas de estudos no sentido do controle da alergia, induzindo a mecanismos de tolerância à proteína do leite de vaca.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A utilização do teste de desencadeamento aberto com leite de vaca, segundo o protocolo da Sociedade de Gastroenterologia, mostrou-se prático para o diagnóstico de APLV em lactentes no dia-a-dia de um consultório de pediatria.

Os linfócitos CD4+CD25+ apresentam maior evidência nas crianças e mães dos grupos atópicos que no grupo controle.

Observa-se uma tendência de maior número de linfócitos CD4+CD25+ no grupo alérgico ao leite de vaca para as crianças e não para as mães.

A determinação das citocinas séricas relacionadas aos fenótipos Th1 e Th2, respectivamente, IL -2, TNF- α , INF- γ e IL-4, IL -5, IL -10, pelos grupos estudados, não apresentou diferenças estatísticas significantes ($p>0,05$). Porém observa-se uma tendência do fenótipo Th2 com secreção de IL-10 no grupo APLV.

Na determinação da IgE total houve uma maior presença no grupo APLV, porém não significativa ($p>0,05$).

Encontramos IgE específica positiva para α lactoalbumina e β lactoglobulina, no grupo APLV.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

- 1 WOISKI, J R – Nutrição e Dietética em Pediatria. 4^a edição – Rio de Janeiro. Livr. Atheneu editora , 1994.
- 2 SLY R.M. Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82 :233-48
- 3 Coca AF, Cooke RA. On the classification of the phenomenon of hypersensitiveness. *J Immunol* 1923; 8:163.
- 4 Cookson WOCM, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1989;1:1292.
- 5 Colee JM, Ten Kate LP, de Vries HG, et al. Allele sharing chromosomes 11q13 and in sibs with asthma and atopy. *Lancet* 1993; 342:936.
- 6 Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, et al. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994; 264:1152.
- 7 Meyers DA, Postma DS, Panhuysen CIEM, et al. Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5. *Genomics* 1994; 23:464.
- 8 Kaliner MA. Allergic Asthma. In :Barry E Brenner. *Emergency Asthma*. NewYork: Marcel Dekker;1999:81-89.
- 9 Sutton, BJ, Gould HJ. The human IgE network. *Nature* 1993; 366:421.
- 10 Amlot PL, Green LA. Atopy and immunoglobulin E concentrations in Hodgkin's and other lymphomas. *BMJ* 1978; 11:327.
- 11 Levo Y, Shalit M, Wollner S, Fich A. Serum IgE levels in patients with inflammatory bowel disease. *Ann Allergy* 1986; 56:85.
- 12 Grieco MH. Immunoglobulins and hypersensitivity in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84:11.
- 13 Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Thinus G. Hyperglobulinemia E syndrome with recurrent infections (Job's syndrome). *Rev Med Interne* 1999; 20:133.
- 14 Cline MG, Burrow, BB. Distribution of allergy in a population sample residing in Tucson, Arizona. *Thorax* 1989; 44:425.
- 15 Peat, JK, Britton WJ, Salome CM, Woolcock AJ. Bronchial hyperresponsiveness in two populations of Australian school children III. Effect of exposure to environmental allergens. *Clin Allergy* 1987; 17:271.
- 16 TRINDADE J.C. The importance of diagnose of allergy in early wheezing. *Pediatr Allergy Immunol* 1998;9:23-29

- 17 KULIG M, BERGMANN R, KLETTKE U, et al Natural course of sensitization to food and inhalant allergens during the first 6 years of life. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 1173-9.
- 18 ILLI S, von MUTIUS E, LAU S, et al. The pattern of atopic sensitization is associated with the development of asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:709-14.
- 19 HALKEN S..Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15 (Suppl. 16):9-32
- 20 MOFFAT MF, COOKSON W. Gene identification in asthma and allergy. *Arch Allergy Immunol* 1998; 116: 247-52.
- 21 WAHN U, VON MUTIUS E. Childhood risk factors for atopy and the importance of early intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:567-74.
- 22 BERGMANN R L , EDENHARTER G, BERGMANN, K E , GUGGENMOOS-HOLZAMANN I, et al. Predictability of early atopy by cord blood- IgE and parental history . *Clin Exp allergy* 1997; 27:752-60.
- 23 KJELLMAN N. Atopic disease in seven-year-old children. *Acta Paediatr Scand* 1977; 66: 565-7.
- 24 HANSEN LG, HALKEN S, HOST A et al. Prediction of allergy from family history and cord blood IgE levels. A follow-up at the age of 5 years. *Cord blood IgE IV. Allergy Immunol* 1993; 4: 34 -40.
- 25 ZEIGER R S. Food allergen avoidance in the prevention of food allergy in infants and children. *Pediatrics* 2003: 111:1662-71.
- 26 WANG J, SAMPSON H A. Nutrition in infant allergy. *Nutr Today* 2006; 41:215-8.
- 27 CRONER S. Prediction and detection of allergy development: influence of genetic and environmental factors. *J Pediatr* 1992: 121 (Pt 2): S58- 63.
- 28 NILSSON L. Risk factors for atopic disease in childhood (Linköping University Medical Dissertation n° 556).Linköping University; 1998.
- 29 WILSON AC, FORSYTH JS, GREENE AS IRVINE L, HAU C, HOWIE P. Relation of infant diet to childhood health: seven year follow up of cohort of children in dundee infant feeding study. *BMJ* 1998: 316:21-5.
- 30 FRIEDMAN,N.J. and ZEIGER, R.S.. The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. *J.Allergy Clin Immunol*, 2005 115, 6: 1238-1248.
- 31 ODIJK,J. van, KULL, I., BORRES,M.P.,BRANDTZAEG,P .Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966-2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. *Allergy*, 2003 :58:933-843.

- 32 BOTTCHER M, MALIN F, JENMALM M, GAROFALO R, BJORKSTEN B. Cytokines in breast milk from allergic and nonallergic mothers. *Pediatr Res* 2000; 47:157-62.
- 33 KALLIOMAKI 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. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104: 1251-7.
- 34 LABETA MO, VIDAL K, NORES JER ARIAS M, VITA N, MORTGAN BP. Innate recognition of bacterial in human milk is mediated by a milk-derived highly expressed pattern recognition receptor, soluble CD14. *J Exp Med* 2000; 191: 1807-12.
- 35 DUCHENK, CASA R, FAGERAS-BOTHER M, YU G, BJORKSTEN B. Human milk polyunsaturated long-chain fatty acids and secretory immunoglobulin A antibodies and early childhood allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2000; 11:29-39.
- 36 OSTERLUND P, SMEDBERG T, HAKULINEN A, HEIKKILA H, JARVINE KM. Eosinophil cationic protein in human milk is associated with development of cow's milk allergy and atopic eczema in breast-fed infants. *Pediatr Res* 2004; 2004:55:296-301.
- 37 American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition. Hypoallergenic infant formulas . *Pediatrics* 2000;106:346-9.
- 38 HOST A, KOLETZKO B, DREBORG S, MURARO A, et al. Dietary products used in infants for treatment and prevention of food allergy. Joint Statement of the European Society for Paediatric Allergology and Clinical Immunology (ESPACI) Committee on Hypoallergenic Formulas and the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition. *Arch Dis Child* 1999; 81: 80-4.
- 39 KAILA, M., VANTO, T., et al. Diagnosis of food allergy in Finland: Survey of pediatric practices. *Pediatr Allergy Immunol* 2000;11:246-249.
- 40 OSTERBALLE, M., HANSEN, T.K., MORTZ, C.G., HOST, A., BINDSLEV-JENSEN, C.. The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults. *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16:567-573.
- 41 JÄVIREN, K.M. and SUOMALAINEN, H.. Development of cow's milk allergy in breast-fed infants. *Clinical and Experimental Allergy*, 2001, 31, 978-987.
- 42 SAARINEN K M, JUNTUNE-BACKMAN K, et al. Supplementary feeding in maternity hospitals and the risk of cow's milk allergy: a prospective study of 6209 infants. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:457-61.
- 43 BOCK AS, SAMPSON HA. Food allergy in infancy. *Pediatr Clin North Am* 1994; 41:1047-67.

- 44 MEGLIO,P., BARTONE,E.,PLANTAMURA,M., ARABITO,E. GIAMPIETRO,P.G..A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy* 2004, 59:980-987.
- 45 NIGGEMANN B, BEYER K .Pitfalls in double-blind, placebo-controlled oral food challenges. *Allergy* 2007: 62: 729-732.
- 46 ROBERTS S. Challenging times for food allergy tests. *Arch Dis. Child.* 2005, 90; 564-566.
- 47 VIEIRA M C, SPOLIDORO J V N, MORAIS M B, TOPOROVSKI M S. Guia de diagnóstico e tratamento da Alergia à Proteína do Leite de Vaca. Sociedade de Gastroenterologia Pediátrica.
- 48 SOLÉ D, SILVA L R, ROSÁRIO FILHO N A, SARNI R O S. Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2007. *Revista Bras. Alerg. Immunopatol.*,- vol. 31 , nº 2, 2008.
- 49 VIEIRA MC, TOPOROVSKI M, MORAIS MB, SPOLIDOROJV, FONSECA MC ARAUJO GT, CASTRO H , OSMO H .Cow's Milk Allergy in children : A Survey on its main features in Brazil.*Journal of Parenteral and enteral Nutrition (JPEN)*. 20054 Jan; 29(1) S27.
- 50 The European Society For Paediatric Gastroenterology and Nutrition Working Group for the Diagnostic Criteria for Food Allergy. Diagnostic criteria for allergy with predominantly intestinal symptoms. *J Paediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 14 (1):108-12.
- 51 BINDSLEV-JENSEN C, BALLMER-WEBER B K, BENGTSSON U, et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods-position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* , 2004 : 59: 690-697.
- 52 GELLERSTEDT M, BENGTSSON U, NIGGEMANN B. Methodological Issues in the Diagnostic Work –up of Food Allergy: A Real Challenge. *J Investig Allergol Clin Immunol*; 2007; vol. 17(6) : 350-356.
- 53 SHEK,L.P.C. , BARDINA,L. CASTRO,R. SAMPSON,H.A. , BEYER,K. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy*, 2005 :60:912-919.
- 54 WAL JM. Cow's milk proteins/allergens.*Ann Allergy Asthma Immunol* 2002: 89:3-10.
- 55 KESKIN, O . TUNCER, A . et al Evaluation of the utility of atopy patch testing, skin prick testing, and total and specific IgE assays in the diagnosis of cow's milk allergy.*Annals of Allergy,Asthma & Immunol* volume 94,may 2005: 553-560.
- 56 RICCI,G. et al. A comparison of different allergometric tests, skin prick test, Pharmacia UNiCAP® and ADVIA Centaur®, for diagnosis of allergic diseases in children .*Allergy*,2003 :58:38-45.

- 57 SCHADE,R.P.. Cell-surface expression of CD25, CD 26, and CD30 by allergen-specific T cells is intrinsically different in cow 's milk allergy. J allergy clin Immunol , february 2002, volume 109,number 2: 357-362.
- 58 ÖSTERLUND,P. and SUOMALAINEN H. Low frequency of CD4+, but not CD8+, T cells expressing interferon- γ is related to cow's milk allergy in infancy.Pediatr Allergy Immunol 2002;13:262-268.
- 59 MOTRICH,R.D., GOTTERO,C. et al. Cow's milk stimulated lymphocyte proliferation and TNF α secretion in hypersensitivity to cow's milk protein. Clinical Immunology 2003 .109 , 203-211.
- 60 TIEMESSEN,M.M. et al. Cow's milk-specific T-cell reactivity of children with and without persistent cow's milk allergy : key role for IL10. J Allergy Clin Immunol , 2004 , 113: 932-939.
- 61 KARLSSON, M.R. et al. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. J Exp. Med, 2004, 199:1679-1688.
- 62 VILJANEN ,M. et al. Probiotic effects on faecal inflammatory markers and on faecal IgA in food allergic atopic eczema/dermatitis syndrome infants. Pediatr Allergy Immunol 2005;16: 65-71.
- 63 VILJANEN,M. et al. Induction of inflammation as a possible mechanism of probiotic effect in atopic eczema-dermatitis syndrome.J Allergy Clin Immunol june 2005, volume 115, number 6 :1254-1259.
- 64 POHJAVUORI,E. VILJANEN,M. et al. Lactobacillus GG effect in incrasing IFN- γ production in infants with cow's milk allergy. J Allergy Clin Immunol 2004, 114:131-136.
- 65 RESOLUÇÃO SS 336, DE 27-11-2007. Protocolo Clínico para Normatização da Dispensação de Fórmulas Infantis Especiais a pacientes com Alergia à Proteína do Leite de Vaca, atendidos pelo SUS, do Estado de São Paulo.
- 66 VANDENPLAS Y, BRUETON M, DUPONT C, HILL D, ISOLAURI E,KOLETZKO S, ORANJE A P, STAIANO A. Guidelines for diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. Arch Dis Child 2007; 92: 902-908.
- 67 UMETSU DT, AKBARI O. DEKRUYFF R H. Regulatory t cells control the development of allergic disease and asthma. J Allergy Clin Immunol 2003; 112: 480-7.
- 68 BELLINGHAUSES I, KÖNIG B , BÖTTCHER I, KNOP J and SALOGA J. Regulatory activity of CD4+CD25+ T cells depends on allergen concentration, type of allergen and atopy status of the donor. Immunology, 2005, 116: 103-111.

- 69 SAARINEN K M , PELKONEN A S, MAKELA M J, SAVILAHTI E. Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *J Allergy Clin Immunol* , 2005, 116: 869-875.
- 70 CHATCHATEE P, JÄRVIREN K-M, BARDINA L, VILA L, BEYER K AND SAMPSOM H A. Identification of IgE and IgG binding epitopes on β - and κ - casein in cow's milk allergic patients. *Clinical and Experimental Allergy*, 2001, vol. 31: 1256- 1262.

Anexos

Anexo I - Protocolo de pesquisa

Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP Araraquara
Protocolo da pesquisa "APLV : uma proposta imunológica"

Identificação _____

Número: _____

Nome _____

Data nascimento _____ idade _____ sexo M () F ()

Endereço _____

CER : _____

Mãe _____ Pai _____

Telefone _____ data : _____ horário do atendimento _____

Queixas e manifestações clínicas :

Data do início dos sintomas : _____ duração : _____

Ganho de peso adequado: sim não

Náuseas e vômitos : sim não

Doença do RGE : sim não

Diarréia : sim não

Dermatite atópica presente : sim não

Urticária aguda (< 6 semanas) : sim não

Rinite alérgica : sim não

Broncoespasmo : sim não

Síndrome de alergia oral : sim não

Anafilaxia gastrointestinal : sim não

Evacuações com estrias de sangue : sim não

Relação entre introdução do alimento e sintomas , tempo :

Melhora do processo com exclusão do alimento :

Persistência dos sintomas após exclusão :

Suspensão leite de vaca e derivados data : _____

Iniciado qual leite : _____ data : _____

Sintomas regrediram :

Quais ? :

Antecedentes

História de doença alérgica

(diagnóstico por médico)

Paciente	Asma	RA	DA	Urticária	diarréia	Vômitos
Mãe	Asma	RA	DA	Urticária	diarréia	Vômitos
Pai	Asma	RA	DA	Urticária	diarréia	Vômitos
Irmãos	Asma	RA	DA	Urticária	diarréia	Vômitos

Exame Físico :

	Peso :	estatura	T	FR	FC
Estado geral :	bom	regular	péssimo		
Pele com lesões :					
Nariz , sintomas :					
Orofaringe :					
Ausculat pulmonar :					
Ausculat cardíaca :					
Outros achados :					

Anexo II - Termo de consentimento

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa

“Alergia ao leite de vaca : uma perspectiva Imunológica “

Pesquisador (médico especialista em alergia):Sílvio César Zeppone CRM 80 887
Local da pesquisa : cidade de Araraquara / consultório médico e Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP

Objetivo e Procedimentos do Trabalho

Senhores pais ou responsáveis;

Este é um estudo desenvolvido pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP e tem por finalidade investigar algumas das prováveis causas dos sintomas da alergia ao leite de vaca. Nosso trabalho se divide em duas etapas: 1) faremos a avaliação clínica das crianças com suspeita de alergia ao leite de vaca, submetendo-as ao teste alérgico denominado **prick test** que será feito pela aplicação na pele da criança de substâncias alergênicas para a confirmação de seu diagnóstico; e outra, onde colheremos dois tubos de 3 mL de sangue das crianças e de suas mães, para avaliação laboratorial de células e proteínas relacionadas com a manifestação alérgica.

Ao participar desse trabalho estará contribuindo para melhorar nossos conhecimentos a respeito dos fatores envolvidos na alergia ao leite de vaca e atuar de forma a controlá-los, diminuindo com isso suas manifestações e conseqüências.

Para a realização dessa pesquisa será necessário a doação de amostras de sangue de seu filho(a) e também da (mãe), onde serão avaliados os linfócitos (células de defesa do organismo e responsáveis pelo desenvolvimento da alergia), os anticorpos IgE específicos para proteínas do leite de vaca e proteínas relacionadas com as atividades alérgica e inflamatória.

A participação da mãe e de seu/sua filho(a) como voluntários deverá ter a duração de 6 meses, a contar de julho de 2007 .

Informamos ainda que:

- nem a mãe ou seu filho(a) serão expostos a riscos ao participar dessa pesquisa e que a coleta de sangue terá desconforto mínimo.
- Os materiais empregados na coleta de sangue serão descartáveis.
- Os retornos ao laboratório ou à clínica serão feitos todas as vezes que solicitado pelo médico responsável, pesquisador desse projeto, sendo estes comparecimentos previstos nos protocolos usados para monitoramento em clínicas de alergia.
- Os procedimentos aos quais serão submetidos não provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por esse trabalho ou pela Instituição (FCF/UNESP).
- O leite que as crianças vão utilizar serão entregues pelos próprios CERs (creches) da prefeitura conforme já realizado .
- Os nomes dos participantes serão mantidos em sigilo, assegurando-lhes a privacidade e se desejar será informado sobre os resultados dessa pesquisa.
- O participante poderá se recusar a participar ou mesmo retirar seu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalidade.

Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimento poderá ser feita pessoalmente ou por telefone com a equipe científica: Médico Sílvio César Zeppone, fone (0xx16) 3335 9290/3331 2493, e, Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa, fone (16) 3332-0486/3301-6100.

Para notificação de qualquer situação, relacionada com os aspectos éticos desse trabalho, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores, deverá ser feita pelo contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0XX16) 3301-6897.

Diante dos esclarecimentos prestados e se de acordo, solicitamos que preencha e assine o presente Termo de Consentimento.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Araraquara, ____ de ____ de 200__

Eu _____

_____, RG _____, Estado Civil _____, Idade _____ anos, Residente na _____

_____, nº _____,

Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____,

Diante dos esclarecimentos prestados, estou de acordo e autorizo além de minha participação a de meu filho(a) _____

_____, impúbere, nascido aos/...../....., como voluntários do estudo sobre "Alergia ao leite de vaca: uma perspectiva imunológica".

Assinatura do Voluntário e Responsável

Assinatura do Pesquisador

Araraquara, __ / __ / ____.

Anexo III- Termo de doação

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP

Termo de doação de material biológico

Nome da pesquisa

“Alergia ao leite de vaca : uma perspectiva Imunológica “

pesquisador (médico especialista em alergia) : Dr. Sílvio César Zeppone CRM 80 887

Local da pesquisa : cidade de Araraquara / consultório médico

Eu,....., RG,
nacionalidade, maior e responsável, estado civil, profissão
....., residente....., cidade,
estado, no pleno gozo de minhas faculdades mentais e de minha livre e espontânea
vontade autorizo a retirar amostra de meu sangue, a qual será doada e utilizada na pesquisa “Alergia ao
leite de vaca : uma perspectiva imunológica ”, sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Sílvio César
Zeppone .

Araraquara,/...../.....

.....

Anexo IV - Tabelas de resultados

Crianças do grupo APLV sintomas presentes e idade de início dos sintomas

Paciente	Idade início	Ganho peso	Náuseas Vômitos	Doença RGE	Diarréia	Dermatite Atópica	Urticária Aguda	Rinite Alérgica	Chiado	Sínd. Oral	Sangue fezes
A1	2,5m	sim	não	não	não	não	não	não	não	não	sim
A2	6m	não	não	não	não	não	não	sim	sim	não	não
A3	15m	não	sim	sim	sim	sim	não	sim	sim	não	não
A4	4m	sim	Sim	sim	sim	não	não	sim	sim	não	sim
A5	1m	não	Não	não	não	não	não	sim	sim	não	sim
A6	2m	não	Sim	sim	não	não	não	sim	não	não	não
A7	4,5m	sim	Não	não	não	sim	não	sim	não	sim	não
A8	4,5m	sim	Não	não	não	não	sim	não	não	não	não
A9	5,5m	sim	Sim	não	sim	sim	não	sim	não	não	não
A10	6m	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não	não
Freqüência	Média 5,1m	50%	40%	40%	40%	40%	20%	80%	50%	10%	30%

Crianças grupo APLV – relação da introdução do leite de vaca com sintomas e teste do desencadeamento aberto ao leite de vaca.

Paciente	Introdução do leite de vaca com presença sintomas	Melhora com exclusão do leite de vaca	Sintomas que persistiram: Rinite alérgica, chiado	Teste do desencadeamento aberto ao leite de vaca imediato (2horas)	Teste do desencadeamento ao leite de vaca tardio (7-30 dias)
A1	sim	sim	Não	positivo	/
A2	Sim	sim	sim	negativo	positivo
A3	Sim	sim	Sim	negativo	positivo
A4	Sim	sim	Sim	negativo	positivo
A5	Sim	sim	sim	positivo	/
A6	Sim	sim	sim	positivo	/
A7	Sim	sim	não	positivo	/
A8	Sim	sim	não	positivo	/
A9	Sim	sim	sim	positivo	/
A10	Sim	sim	sim	negativo	positivo
Freqüência	100%	100%	66,6%	60%	40%

Crianças do grupo APLV – Fenotipagem linfocitária por Citometria de fluxo

paciente	Leucócitos totaisx 10 ³	Linfócitos totaisx10 ³	% gated	CD3CD4 positivos	% gated	CD3CD8 positivos	% gated	CD4CD25 positivos	Relação CD4/CD8
A1	8,1	4,7x10 ³	30,47	1432	11,37	534	0,36	17,0	2,68
A2	9,0	2,5x10 ³	29,64	741	21,26	531	0,17	4,25	1,40
A3	9,5	5,6x10 ³	19,5	1092	24,3	1360	0,09	5,04	0,80
A4	12,6	5,0x10 ³	42,63	2131	17,88	894	0,15	7,50	2,40
A5	7,3	3,4x10 ³	51,43	1749	15,52	528	0,05	1,70	3,32
A6	7,6	4,3x10 ³	45,27	1946	16,52	710	0,10	4,30	2,74
A7	13,0	7,0x10 ³	50,56	3539	19,7	1379	1,15	80,5	2,60
A8	8,9	5,5x10 ³	40,78	2242	12,48	686	0,02	1,10	3,20
A9	8,3	5,8x10 ³	48,80	2830	17,23	999	0,0	0	2,80
A10	10,2	4,7x10 ³	30,35	1426	10,86	510	0,84	40,0	2,80
Média	9,45 ±1,96	4,85±1,27	38,90	1913±1850	15,6	813±340	0,29	16,0±25	2,48

Crianças do grupo AC – Fenotipagem linfocitária por Citometria de fluxo

paciente	Leucócitos totais x10 ³	Linfócitos totaisx10 ³	% gated	CD3CD4 positivos	% gated	CD3CD8 positivos	% gated	CD4CD25 positivos	Relação CD4/CD8
B1	7,3	3,9	27,93	1089	13,68	533	0,22	8,6	2,04
B2	16,6	6,1	34,71	2117	23,28	1420	0,18	11,0	1,50
B3	6,3	3,5	32,79	1148	30,98	1084	0,15	5,3	1,10
B4	11,1	6,2	39,0	2481	28,45	1764	0,11	7,0	1,40
B5	7,5	4,3	41,7	1793	19,28	829	0,13	5,6	2,16
B6	9,5	7,2	54,69	3957	11,05	796	0,23	16,6	5,00
B7	9,9	4,8	32,58	1564	18,20	874	0,03	1,44	1,79
B8	6,8	3,8	47,57	1807	17,80	676	0,01	0,40	2,67
Média	9,38±3,36	5,0±1,35	38,9	1995±920	20,3	997±410	0,13	7,0±5,0	2,20

Crianças do grupo NAC – Fenotipagem linfocitária por Citometria de fluxo

paciente	Leucócitos totais x10 ³	Linfócitos totaisx10 ³	% gated	CD3CD4 positivos	% gated	CD3CD8 positivos	% gated	CD4CD25 positivos	Relação CD4/CD8
C1	8,5	6,1	26,60	1623	13,51	824	0,0	0	1,97
C2	8,9	3,6	37,31	1343	23,39	842	0,0	0	1,60
C3	8,6	5,3	57,45	3044	14,80	785	0,0	0	3,88
C4	13,0	6,1	41,91	2557	18,15	1107	0,0	0	2,30
C5	10,6	6,1	27,25	1662	21,88	1335	0,0	0	2,04
C6	12,5	9,7	31,43	3049	23,31	2261	0,0	0	1,35
C7	11,3	9,7	34,46	1964	21,57	1230	0,0	0,0002	1,60
Média	10,57±2,01	6,65±2,25	36,63	2177±700	19,51	1198±520	0,0	0,0001	2,10

Mães do grupo APLV – Fenotipagem linfocitária por Citometria de fluxo

paciente	Leucócitos totaisx10 ³	Linfócitos totaisx10 ³	% gated	CD3CD4 positivos	% gated	CD3CD8 positivos	% gated	CD4CD25 positivos	Relação CD4/CD8
A11	9,2	3,4	39,46	1342	30,56	1039	0,11	3,7	1,29
A12	6,9	1,8	26,79	482	30,23	544	0,06	1,1	0,90
A13	5,6	1,7	43,14	734	28,72	488	0,27	4,6	1,50
A14	6,8	1,6	32,63	522	8,99	144	0,03	0,50	3,60
A15	8,8	2,8	49,5	1386	21,81	611	0,58	16,2	2,27
A16	5,9	2,3	40,03	920	20,75	477	0,34	7,8	1,92
A17	6,1	2,3	51,4	1182	19,61	451	0,3	7,0	2,62
A18	6,2	2,1	31,92	670	27,67	581	0,0	0,0	1,10
A19	6,4	2,4	44,45	1066	24,86	597	0,0	0	1,79
A20	6,7	2,2	43,42	955	22,07	485	0,17	3,7	1,96
Média	6,9±1,20	2,25±0,54	33,7	926±320	23,5	542±220	0,19	4,46±5,0	1,90

Mães do grupo AC – Fenotipagem linfocitária por Citometria de fluxo

paciente	Leucócitos totais x10 ³	Linfócitos totaisx10 ³	% gated	CD3CD4 positivos	% gated	CD3CD8 positivos	% gated	CD4CD25 positivos	Relação CD4/CD8
B9	12,0	2,4	36,19	870	19,23	462	0,06	1,5	1,90
B10	4,3	1,3	40,87	531	23,36	304	0,14	1,8	1,75
B11	10,2	2,3	42,46	977	30,48	701	0,14	3,2	1,40
B12	7,3	2,1	37,78	793	21,8	458	0,32	6,7	1,73
B13	8,0	1,9	49,64	943	20,72	394	1,35	26	2,39
B14	3,7	1,6	32,78	525	27,47	440	0,15	2,4	1,19
B15	8,5	3,1	39,33	1219	24,82	769	0,0	0	1,58
B16	4,3	1,6	32,86	525	19,36	314	0,01	0,16	1,67
Média	7,3±3,0	2,0±0,57	39,0	798±260	23,40	480±170	0,27	5,22±8,0	1,70

Mães do grupo NAC – Fenotipagem linfocitária por Citometria de fluxo

paciente	Leucócitos totais x10 ³	Linfócitos totaisx10 ³	% gated	CD3CD4 positivos	% gated	CD3CD8 positivos	% gated	CD4CD25 positivos	Relação CD4/CD8
C8	9,0	2,1	38,92	817	39,24	824	0,01	0,2	0,99
C9	7,7	2,9	41,1	1192	25,15	729	0,0	0	1,63
C10	9,5	2,2	34,87	767	18,10	398	0,0	0	1,93
C11	6,8	3,3	30,07	992	25,88	854	0,0	0	1,16
C12	5,7	2,1	46,85	983	26,48	556	0,0	0	1,76
Média	7,74±1,56	2,52± 0,55	30,36	950±170	26,97	672±190	0,001	0,03	1,49

Interleucinas grupo APLV / crianças

	IL4	IL 5	IL10	IL2	TNFα	INFγ
A1	2,80	7,50	2,10	1,80	1,40	0,00
A2	2,40	10,00	15,10	1,80	1,50	5,19
A3	2,90	6,60	3,10	1,70	1,80	0,00
A4	0,00	14,20	3,10	0,00	1,70	4,50
A5	3,20	4,90	2,20	0,00	5,70	3,50
A6	2,80	2,40	3,70	2,30	1,30	0,00
A7	0,00	2,00	2,60	0,00	1,30	1,80
A8	0,00	1,80	2,70	1,80	1,40	0,00
A9	3,40	2,10	1,30	1,80	1,50	0,00
A10	4,40	5,90	4,10	0,00	2,50	2,80
MÉDIA	2,19±1,6	5,74±4,0	4,0±4,0	1,12±1,0	2,01±1,3	1,8± 1,6

Interleucinas grupo NAC crianças

	GRUPO B		CRIANÇAS			
	IL4	IL5	IL10	IL2	TNF α	INF γ
B1	2,60	9,10	2,60	0,00	0,00	0,00
B2	2,10	2,70	1,70	0,00	1,40	0,00
B3	1,30	4,00	3,00	0,00	1,70	0,00
B4	3,70	2,60	2,30	2,80	2,20	4,80
B5	4,10	3,40	2,30	2,80	1,50	0,00
B6	0,00	1,90	1,40	0,00	1,60	0,00
B7	0,00	4,30	1,80	0,00	2,40	0,00
B8	5,80	7,70	4,70	4,80	9,30	12,60
MÉDIA	2,45 \pm 2,0	4,46 \pm 2,6	2,48 \pm 1,0	1,30 \pm 1,9	2,50 \pm 2,8	2,20 \pm 2,8

Intrerleucinas grupo NAC / crianças

	GRUPO C		CRIANÇAS			
	IL4	IL5	IL10	IL2	TNF α	INF γ
C1	2,50	2,20	3,50	2,00	1,60	2,20
C2	2,90	2,90	6,50	2,00	1,60	3,00
C3	3,90	2,40	0,00	1,80	2,60	0,00
C4	3,40	2,20	1,70	3,40	2,10	2,80
C5	4,20	3,80	2,40	2,90	1,30	0,00
C6	3,80	3,60	1,70	0,00	2,40	2,80
C7	2,40	2,40	1,80	0,00	2,40	2,80
MÉDIA	3,30 \pm 0,7	2,8 \pm 0,7	2,51 \pm 2,0	1,73 \pm 1,30	2,0 \pm 0,5	2,0 \pm 1,4

Interleucinas grupo APLV mães

	GRUPO A		MÃES			
	IL4	IL5	IL10	IL2	TNF α	INF γ
A11	2,10	1,20	1,30	0,00	0,00	0,00
A12	0,00	3,40	0,00	0,00	0,00	0,00
A13	1,80	3,20	0,00	0,00	0,00	0,00
A14	1,80	3,00	2,70	2,60	1,40	2,20
A15	2,90	5,60	2,30	3,00	2,00	4,50
A16	0,00	1,90	0,00	0,00	0,00	0,00
A17	3,30	3,00	1,90	3,80	2,50	5,70
A18	2,20	2,20	2,60	2,90	2,10	5,60
A19	0,00	2,10	0,00	0,00	1,30	0,00
A20	4,40	4,10	2,00	2,60	2,60	4,00
MÉDIA	1,85 \pm 1,5	2,97 \pm 1,3	1,28 \pm 1,2	1,49 \pm 1,6	1,19 \pm 1,1	2,20 \pm 2,5

Interleucinas grupo AC mães

	GRUPO B		MÃES			
	IL4	IL5	IL10	IL2	TNF α	INF γ
B9	3,30	1,80	0,00	1,50	1,50	0,00
B10	1,30	4,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B11	3,80	5,20	2,40	2,90	2,70	3,80
B12	1,30	4,00	2,30	0,00	1,40	0,00
B13	2,70	2,70	1,50	2,30	1,70	0,00
B14	2,90	1,50	1,70	0,00	1,70	0,00
B15	0,00	1,80	0,00	0,00	1,50	0,00
B16	0,00	2,20	2,40	1,80	1,70	0,00
MÉDIA	1,91 \pm 1,5	2,90 \pm 1,3	1,29 \pm 1,1	1,06 \pm 1,2	1,52 \pm 0,7	0,48 \pm 1,3

Interleucinas grupo NAC

	GRUPO C		MÃES			
	IL4	IL5	IL10	IL2	TNF α	INF γ
C8	3,70	2,40	1,80	2,00	1,50	0,00
C9	3,70	2,40	2,20	2,00	2,40	2,00
C10	5,10	2,00	1,40	0,00	2,10	0,00
C11	3,70	2,20	1,60	0,00	3,10	4,50
C12	3,10	5,30	2,70	2,30	4,30	9,40
MÉDIA	3,86 \pm 0,7	2,86 \pm 1,4	1,94 \pm 0,5	1,26 \pm 1,2	2,68 \pm 1,1	3,18 \pm 3,9

IgE total e específico ao leite no grupo Crianças APLV

paciente	IgE total UI/ml	Caseína KU _A /l	α lactoalbumina KU _A /l	β lactoglobulina KU _A /l
A1	1,50	0	0	0
A2	4,0	0	0	0
A3	9,0	0	0	0
A4	7,0	0	0	0
A5	28,0	0	0	0
A6	3,0	0	0	0
A7	118,0	0	2,60	0,41
A8	23,0	0,43	0	4,05
A9	7,0	0,65	2,48	1,06
A10	361,0	0	2,70	1,03
Média	56,1 \pm 112,6	0,108 \pm 0,23	0,778 \pm 1,25	0,655 \pm 1,27

IgE total e específico ao leite no grupo crianças AC

paciente	IgE total UI/ml	Caseína KU _A /l	α lactoalbumina KU _A /l	β lactoglobulina KU _A /l
B1	1,50	0	0	0
B2	14,0	0	0	0
B3	1,50	0	0	0
B4	16,0	0	0	0
B5	12,0	0	0	0
B6	7,0	0	0	0
B7	2,0	0	0	0
B8	53,0	0	0	0
Média	13,37±17	0	0	0

IgE total e específico ao leite no grupo crianças NAC

paciente	IgE total UI/ml	Caseína KU _A /l	α lactoalbumina KU _A /l	β lactoglobulina KU _A /l
C1	5,0	0	0	0
C2	3,0	0	0	0
C3	17,0	0	0	0
C4	11,0	0	0	0
C5	3,0	0	0	0
C6	8,7	0	0	0
C7	5,0	0	0	0
Média	7,52±5,12	0	0	0

IgE total e específico ao leite no grupo mães APLV

paciente	IgE total UI/ml	Caseína KU _A /l	α lactoalbumina KU _A /l	β lactoglobulina KU _A /l
A11	3,0	0	0	0
A12	8,0	0	0	0
A13	10,0	0	0	0
A14	3,0	0	0	0
A15	413,0	0	0	0
A16	113,0	0	0	0
A17	58,0	0	0	0
A18	11,0	0	0	0
A19	29,0	0	0	0
A20	1,0	0	0	0
Média	64,9±127,3	0	0	0

IgE total e específico ao leite no grupo mães AC

paciente	IgE total UI/ml	Caseína KU _A /l	α lactoalbumina KU _A /l	β lactoglobulina KU _A /l
B11	1,5	0	0	0
B12	79,0	0	0	0
B13	44,0	0	0	0
B14	144,0	0	0	0
B15	18,0	0	0	0
B16	3,0	0	0	0
B17	2,0	0	0	0
B18	6,0	0	0	0
Média	37,2±51,02	0	0	0

IgE total e específico ao leite no grupo mães AC

paciente	IgE total UI/ml	Caseína KU _A /l	α lactoalbumina KU _A /l	β lactoglobulina KU _A /l
C8	1,80	0	0	0
C9	5,0	0	0	0
C10	3,8	0	0	0
C11	2,0	0	0	0
C12	3,0	0	0	0
Média	3,12±1,32	0	0	0

Anexo v - Comitê de ética

O presente projeto foi aprovado junto ao comitê de ética desta Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ Unesp car.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 14/2006

Interessado: SÍLVIO CÉSAR ZEPPONE

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Projeto: ALERGIA AO LEITE DE VACA: UMA PERSPECTIVA
IMUNOLÓGICA

Parecer nº 11/2007 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto "Alergia ao leite de vaca: uma perspectiva imunológica", encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Por essa razão, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade considera o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do projeto de pesquisa deverá ser entregue em novembro de 2007 no qual deverá constar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 20 de março de 2007.

Profª. Drª. MARIA VIRGINIA C. SCARPA
Coordenadora do CEP