

**Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente**

**Silvia Alves da Silva**

**Polimorfismos dos genes das citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ 1), inflamatória (IL-4) e do receptor de vitamina D em relação aos fenótipos clínicos da alergia às proteínas do leite de vaca**

**Recife  
2016**

**Silvia Alves da Silva**

**Polimorfismos dos genes das citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ 1), inflamatória (IL-4) e do receptor de vitamina D em relação aos fenótipos clínicos da alergia às proteínas do leite de vaca**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Saúde da Criança e do Adolescente.

Área de Concentração: Abordagens Quantitativas em Saúde

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

**Recife  
2016**

Catálogo na fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa- CRB4-1010

S586p Silva, Silvia Alves da.  
Polimorfismos dos genes das citocinas regulatórias (IL-10 e TGF-  $\beta$ 1),  
inflamatória (IL-4) e do receptor de vitamina D em relação aos fenótipos  
clínicos da alergia às proteínas do leite de vaca / Silvia Alves da Silva. – 2016.  
130 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientador: Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Recife,  
2016.  
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Hipersensibilidade a leite. 2. Polimorfismo genético. 3. Citocinas. 4.  
Receptor de vitamina D. 5. Crianças. I. Sarinho, Emanuel Sávio Cavalcanti  
(Orientador). II. Título.

618.92

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-247)

**Silvia Alves da Silva**

**Polimorfismos dos genes das citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ 1), inflamatória (IL-4) e do receptor de vitamina D em relação aos fenótipos clínicos da alergia às proteínas do leite de vaca**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Saúde da Criança e do Adolescente.

Tese aprovada em: 30/08/2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Gisélia Alves Pontes da Silva (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria das Graças Mouras Lins (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Caroline Cavalcanti Dela Bianca Melo (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Goretti Pessoa de Araújo Burgos (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITOR**

Prof. Dra. Florisbela de Arruda Câmara Siqueira Campos

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Ernani Rodrigues Carvalho Neto

**DIRETOR CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**VICE-DIRETORA**

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

**COORDENADORA DA COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO CCS**

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

**COLEGIADO**

**CORPO DOCENTE PERMANENTE**

Profa. Dra. Luciane Soares de Lima (Coordenadora)

Profa. Dra. Claudia Marina Tavares de Araújo (Vice Coordenadora)

Prof. Dr. Alcides da Silva Diniz

Profa. Dra. Ana Bernarda Ludermit

Profa. Dra. Andréa Lemos Bezerra de Oliveira

Prof. Dr. Décio Medeiros Peixoto

Prof. Dr. Emanuel Savio Cavalcanti Sarinho

Profa. Dra. Estela Maria Leite Meirelles Monteiro

Profa. Dra. Gisélia Alves Pontes da Silva

Profa. Dra. Maria Gorete Lucena de Vasconcelos

Profa. Dra. Marília de Carvalho Lima

Prof. Dr. Paulo Sávio Angeiras de Góes

Prof. Dr. Pedro Israel Cabral de Lira

Profa. Dra. Poliana Coelho Cabral

Profa. Dra. Sílvia Wanick Sarinho

Profa. Dra. Sophie Helena Eickmann

(Maria de Fátima Cordeiro Trajano - Representante discente - Doutorado)

(Rhayssa Ferreira Brito - Representante discente -Mestrado)

**CORPO DOCENTE COLABORADOR**

Profa. Dra. Bianca Arruda Manchester de Queiroga

Profa. Dra. Cleide Maria Pontes

Profa. Dra. Daniela Tavares Gontijo

Profa. Dra. Kátia Galeão Brandt

Profa. Dra. Margarida Maria de Castro Antunes

Profa. Dra. Rosalie Barreto Belian

Profa. Dra. Sílvia Regina Jamelli

**SECRETARIA**

Paulo Sergio Oliveira do Nascimento (Secretário)

Juliane Gomes Brasileiro

Leandro Cabral da Costa

**Dedico esta tese a professora Maria Eugênia Motta, que idealizou este trabalho, e aos meus pais, Maria José e Heleno, que com muito amor, carinho e dedicação me moldaram para a vida.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me permitiu viver essas experiências e completar mais esta etapa em minha vida.

À Professora Maria Eugênia Motta, que acreditou no meu potencial, me incentivou e me conduziu no início desse processo, você estará sempre nos meus pensamentos e nas minhas orações.

Ao meu orientador, Emanuel Sarinho, por todo conhecimento transmitido, pelo apoio e pela confiança em mim depositada.

Ao pesquisador Luydson Vasconcelos, por todos os ensinamentos, pelo apoio e pela disponibilidade em ajudar em todas as etapas da tese.

À professora Gisélia Silva, pelos ensinamentos valiosos que contribuíram para minha formação e para a conclusão deste estudo.

Às médicas Nilza Lyra, Margarida Antunes e Kátia Brandt, aos residentes e profissionais dos ambulatórios de pediatria do Hospital das Clínicas, pelo apoio na coleta de dados.

À minha amiga e colega de pesquisa, Cristiane Marrocos, por dividimos as atribuições, alegrias e tristezas, seu apoio foi fundamental.

Às alunas bolsistas Amanda Magalhães e Parisina Carvalho, pelo auxílio na execução desse trabalho.

Aos colaboradores do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Fígado de Pernambuco, em especial Andreia Soares e Taciana Mendonça, pela ajuda valiosa para a execução desse trabalho.

Aos companheiros de turma do doutorado, Carlos Andrade, Elisabete Pereira, Marco

Valois, Isabelle Muniz, Ricardo Guerra e Fabiana Pastich, pelos laços de amizade, incentivo e todos os conhecimentos compartilhados.

Aos professores da Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente e à equipe técnica, em especial Paulo Nascimento e Juliene Brasileiro, Janaína Paz e Leandro Costa, pela dedicação e compromisso com a POSCA.

As crianças, mães, pais e responsáveis que aceitaram participar, permitindo a realização deste estudo.

Agradeço a todos que contribuíram para realização desse trabalho, direta ou indiretamente, em especial a minha família e amigos, pelo incentivo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro para a realização dessa pesquisa.



***“Se temos de esperar, que seja para colher a semente boa que lançamos hoje no solo da vida. Se for para semear, então que seja para produzir milhões de sorrisos, de solidariedade e amizade”.***

**(Cora Coralina)**

## RESUMO

A alergia às proteínas do leite de vaca (APLV) é definida como uma reação adversa imunologicamente mediada. A complexidade da APLV é observada tanto no espectro de apresentações clínicas como na sua história natural, e na sua etiologia, sobrepondo-se fatores genéticos e ambientais. O objetivo deste estudo foi analisar a frequência de polimorfismos nos genes das citocinas regulatórias (TGF- $\beta$ 1 e IL-10), inflamatória (IL-4) e no gene do receptor de vitamina D (VDR) em crianças com e sem APLV. A amostra foi selecionada por conveniência, com coleta de dados nos ambulatórios de Gastroenterologia Pediátrica, Alergia e Imunologia Pediátrica e Puericultura do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, entre abril de 2013 a junho de 2015. Foram avaliadas 154 crianças. Destas, 70 foram diagnosticadas com APLV (casos) e 84 eram saudáveis (grupo comparativo). O grupo com APLV apresentou maior proporção de crianças menores de um ano de idade (68,6% vs 35,7%;  $p=0,000$ ), nascidos através de cesariana (85,7% vs 67,9%;  $p=0,010$ ), com pais e mães com nível de escolaridade elevada e maior frequência de mães com atopia (55,7% vs 33,3%;  $p=0,005$ ), em relação ao grupo comparativo. Dentre os casos, 31 (44,3%) foram classificados como portadores de sintomas predominantemente gastrintestinais e 39 (55,7%) com manifestação de sintomas cutâneos/respiratórios/anafilaxia. A idade (mediana) ao início dos sintomas foi menor no grupo gastrintestinal (30 dias vs 90 dias,  $p=0,000$ ), quando comparado ao grupo cutâneo/respiratório/anafilaxia. Ao término do estudo, a ausência de sintomas foi identificada em 29 (41,4%) das 70 crianças com APLV. A idade (mediana) nesse período foi menor no grupo gastrintestinal, em comparação ao grupo cutâneo/respiratório/anafilaxia (16 meses vs 20 meses;  $p=0,036$ ). A análise dos polimorfismos genéticos não apresentou diferença significativa nas frequências genotípicas e alélicas para os genes das citocinas TGF- $\beta$ 1 (-509), IL-10 (-1082, -819 e -592), IL-4 (-590), receptor de IL-4 (IL-4R) e VDR (Fok I e Taq I) entre os casos e o grupo comparativo e entre os dois grupos de fenótipos clínicos e o grupo comparativo. Após controle para possíveis fatores de confusão, a cesariana (OR= 2,68; IC95%: 1,16 – 6,20) e a atopia materna (OR= 2,45; IC95%: 1,00 – 3,85) foram as variáveis associadas a maior chance para desenvolver APLV no grupo estudado. Quando estratificadas por fenótipo clínico, a menor duração do aleitamento materno exclusivo (OR= 4,85; IC95%: 1,81 – 13,03) e a atopia materna (OR= 3,59; IC95%: 1,44 – 8,92) foram associadas ao fenótipo clínico gastrintestinal, enquanto a cesariana (OR= 3,50; IC95%: 1,20 – 10,23) e o nascer prematuro (OR= 3,19; IC95%: 1,07 – 9,49) foram associados ao aumento da chance para o fenótipo clínico de reações cutâneas/respiratórias/anafilaxia. Concluiu-se que os polimorfismos nos genes das citocinas tolerogênicas (TGF- $\beta$ 1 e IL-10), inflamatória (IL-4) e do gene VDR (Fok I e Taq I) não apresentaram associação estatística com a APLV e os respectivos fenótipos clínicos. Contudo, a atopia materna, a menor duração do aleitamento materno exclusivo, a cesariana e a prematuridade apresentaram associação, podendo indicar que o ambiente pode exercer um efeito potencialmente maior sobre a patogênese dessa enfermidade.

**Palavras-chave:** Hipersensibilidade a leite. Polimorfismo genético. Citocinas. Receptor de vitamina D. Crianças.

## ABSTRACT

Cow's milk protein allergy (CMPA) is defined as an immunologically mediated adverse reaction. The complexity of CMPA is demonstrated both in the range of clinical presentations and its natural history as well as the etiology, with the overlapping of genetic and environmental aspects. The aim of the present study was to analyze the frequency of polymorphisms in the genes of regulatory (TGF- $\beta$ 1 and IL-10) and inflammatory (IL-4) cytokines as well as the gene of the vitamin D receptor (VDR) in children with and without CMPA. A convenience sample was used. Data were collected at the pediatric gastroenterology and pediatric allergy and immunology clinics of the hospital pertaining to the Federal University of Pernambuco (Brazil) between April 2013 and June 2015. A total of 154 children were evaluated, 70 of whom were diagnosed with CMPA (cases) and 84 were considered healthy (comparative group). The group with CMPA had higher proportions of children less than one year of age (68.6% vs. 35.7%;  $p=0.000$ ), those born by cesarean section (85.7% vs. 67.9%;  $p=0.010$ ), those whose parents had a high level of schooling and those whose mothers had atopy (55.7% vs. 33.3%;  $p=0.005$ ) in comparison to the comparative group. Among the cases, 31 (44.3%) were classified as having predominantly gastrointestinal symptoms and 39 (55.7%) were diagnosed with skin/respiratory/anaphylaxis symptoms. Median age at the onset of symptoms was lower in the gastrointestinal group in comparison to the skin/respiratory/anaphylaxis group (30 days vs. 90 days,  $p=0.000$ ). At the end of the study, an absence of symptoms was found in 29 of the 70 children with CMPA (41.4%). Median age in this period was lower in the gastrointestinal group than the skin/respiratory/anaphylaxis group (16 months vs. 20 months;  $p=0.036$ ). The analysis of genetic polymorphisms revealed no significant differences in genotypic or allelic frequencies for the genes of the cytokines TGF- $\beta$ 1 (-509), IL-10 (-1082, -819 and -592), IL-4 (-590), IL-4 receptor (IL-4R) or vitamin D receptor-VDR (Fok I and Taq I) between the case and comparative groups or between the two clinical phenotype groups and comparative group. After controlling for possible confounding factors, cesarean delivery (OR=2.68; 95%CI: 1.16-6.20) and maternal atopy (OR=2.45; 95%CI: 1.00-3.85) were associated with a greater chance of developing CMPA. When stratified based on clinical phenotype, a shorter duration of exclusion breastfeeding (OR=4.85; 95%CI: 1.81-13.03) and maternal atopy (OR=3.59; 95%CI: 1.44-8.92) were associated with the gastrointestinal phenotype, whereas cesarean birth (OR=3.50; 95%CI: 1.20-10.23) and premature birth (OR=3.19; CI95%: 1.07-9.49) were associated with an increased chance of the clinical phenotype of skin/respiratory/anaphylaxis reactions. In conclusion, polymorphisms in the genes of tolerogenic (TGF- $\beta$ 1 and IL-10) and inflammatory (IL-4) cytokines and the VDR gene (Fok I and Taq I) were not significantly associated with CMPA or its clinical phenotypes. However, maternal atopy, a shorter duration of exclusion breastfeeding, cesarean delivery and premature birth were associated, which indicates that the environment can have a potentially greater effect on the pathogenesis of this disease.

**Key words:** Hypersensitivity to milk; Genetic polymorphism; Cytokines; Vitamin D receptor; Child.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<b>Pág.</b>
Quadro 1 - Descrição das variáveis de estudo	60
Quadro 2 - Polimorfismos de única base (SNPs) avaliados na pesquisa	68
Quadro 3 - Perdas de genotipagem	72
Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do gene IL-10	30
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura do gene VDR.	34
Figura 3 - Modelo explicativo dos possíveis fatores relacionados ao desenvolvimento da APLV.	56
Figura 4 - Fluxograma da distribuição dos participantes da pesquisa em seus grupos de estudo.	58
Figura 5 - Idade no início dos sintomas e na ausência de sintomas de APLV, de acordo com o fenótipo clínico.	81

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
Tabela 1 - Características pessoais e familiares de lactentes com alergia à proteína do leite de vaca e grupo comparativo.	75
Tabela 2 - Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos do gene TGF- $\beta$ 1 em crianças com APLV, de acordo com os fenótipos clínicos e no grupo comparativo.	76
Tabela 3 - Frequência genotípica, alélica e haplotípica do gene IL-10 em crianças com APLV, de acordo com os fenótipos clínicos e no grupo comparativo.	77
Tabela 4 - Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos da IL-4 e IL-4R em crianças com APLV, de acordo com os fenótipos clínicos e no grupo comparativo.	78
Tabela 5 - Frequência genotípica dos polimorfismos do gene do receptor de vitamina D nas posições Fok I e Taq I em crianças com APLV, de acordo com os fenótipos clínicos e no grupo comparativo.	79
Tabela 6 - Características das crianças com alergia às proteínas do leite de vaca de acordo com o fenótipo clínico.	80
Tabela 7 - Regressão logística multivariada para possíveis preditores da ocorrência de alergia às proteínas do leite de vaca em relação ao grupo comparativo.	82
Tabela 8 - Regressão logística multivariada para possíveis preditores da ocorrência de fenótipo clínico gastrointestinal da alergia às proteínas do leite de vaca.	83
Tabela 9 - Regressão logística multivariada para possíveis preditores da ocorrência de fenótipo clínico cutâneo/respiratório/anafilaxia da alergia às proteínas do leite de vaca.	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> - 1,25-dihidroxivitamina D

25(OH)D - 25 hidroxivitamina D

APLV - alergia às proteínas do leite de vaca

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

DNA – ácido desoxirribonucleico

E/I - estatura/idade

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ESPGHAN – *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*

FACEPE - Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

FceRI - receptores de alta afinidade para IgE

FoxP3 - *Forkhead box P3*

FPIES - *Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome*

g – grama

GALT – *Gut-Associated Lymphoid Tissue*

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HC - Hospital das Clínicas

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IFP - Instituto do Fígado de Pernambuco

Ig – imunoglobulina

IgAs - imunoglobulina A secretória

IL – interleucina

IL-4R – receptor de interleucina 4

IPEX - *Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked*

IPLV – Intolerância às proteínas do leite de vaca

Kb - quilobyte

LBM - Laboratório de Biologia Molecular

LTC – leucotrieno

MHCII – Complexo maior de histocompatibilidade de classe II

mL – mililitro

ng – nanograma

NK - *Natural Killer*

°C – graus Celsius

OMS - Organização Mundial de Saúde

P/I - peso/idade

PAF - fator ativador de plaquetas

PCR - reação de cadeia de polimerase

PGD – prostaglandinas

PIBIC - Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica

PPGSCA - Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente

RAST - teste radioallergosorbent

RGE – refluxo gastroesofágico

SNP – *Single nucleotide polymorphism*

SPSS - *Statistical Package for Social Sciences*

Tc – células T citotóxicas

TDCPC – teste duplo-cego placebo controlado

TGF-β - Fator Transformador de Crescimento beta

Th – células T *helper*

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa

TPO - teste de provocação oral

Treg – células T reguladoras

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

VDR – *vitamin D receptor*

WAO – *World Allergy Organization*

$\alpha$  – alfa

$\beta$  – beta

$\gamma$  - gama

$\kappa$  - kappa



# SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	<u>Introdução</u>	22
2.2	<u>Alergia alimentar: Natureza vs Ambiente</u>	24
2.2.1	Polimorfismos genéticos	27
2.2.1.1	Polimorfismos dos genes IL-10 e TGF- $\beta$	28
2.2.1.2	Polimorfismos do gene IL-4 e seu receptor	31
2.2.1.3	Polimorfismos do gene receptor de vitamina D	32
2.2.2	O papel imunomodulador da vitamina D	34
2.2.3	Alergia alimentar: fatores associados	38
2.3	<u>APLV: Fenótipos clínicos e mecanismos imunológicos</u>	41
2.4	<u>História natural da APLV</u>	47
2.5	<u>APLV: Quebra da tolerância oral</u>	49
2.5.1	O papel das células Treg na tolerância oral	52
2.5.2	O papel das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- $\beta$	54
2.6	<u>Considerações finais</u>	55
3	MÉTODOS	57
3.1	<u>Local e período do estudo</u>	57
3.2	<u>Delineamento do estudo</u>	57
3.3	<u>Sujeitos do estudo</u>	57
3.3.1	Definição de casos	58
3.3.2	Definição de grupo comparativo	59
3.4	<u>Amostra</u>	60
3.5	<u>Variáveis de estudo</u>	60
3.6	<u>Operacionalização da pesquisa</u>	62
3.6.1	Recrutamento	62
3.6.2	Coleta de dados	62
3.6.3	Identificação	63
3.6.4	Coleta, transporte e armazenamento de material biológico	63
3.6.5	Coleta de informações	64

3.6.5.1	Formulário	64
3.6.5.2	Avaliação nutricional antropométrica	64
3.6.6	Teste de provocação oral	65
3.6.6.1	Acompanhamento	66
3.6.7	Polimorfismos genéticos	66
3.6.7.1	Extração de DNA	67
3.6.7.2	Genotipagem	67
3.7	<u>Análise estatística</u>	68
3.8	<u>Considerações éticas</u>	69
3.9	<u>Recursos financeiros</u>	70
3.10	<u>Problemas metodológicos e limitações</u>	70
4	RESULTADOS	74
4.1	<u>Caracterização geral da amostra</u>	74
4.2	<u>Polimorfismos dos genes das citocinas regulatórias (TGF-<math>\beta</math>1 e IL-10)</u>	76
4.3	<u>Polimorfismos dos genes IL-4 e IL-4R</u>	77
4.4	<u>Polimorfismos do gene do receptor de vitamina D</u>	78
4.5	<u>Características das crianças com APLV</u>	79
4.6	<u>Análise multivariada</u>	81
5	DISCUSSÃO	85
5.1	<u>Polimorfismos dos genes das citocinas regulatórias, inflamatória e do receptor de vitamina D</u>	85
5.5	<u>Características das crianças com APLV</u>	92
5.6	<u>Fatores associados à APLV e seus fenótipos clínicos</u>	94
6	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
	<b>REFERÊNCIAS</b>	104
	<b>APÊNDICE A – Formulário da pesquisa</b>	122
	<b>APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido</b>	125
	<b>ANEXO A – Folha de aprovação do Comitê de Ética</b>	127

# 1 APRESENTAÇÃO

A alergia às proteínas do leite de vaca (APLV) é considerada a alergia alimentar mais comum em lactentes e crianças, com manifestações clínicas variadas. Acredita-se que sua prevalência está aumentando em todo o mundo, em ambos os sexos e em diferentes raças/etnias (SACKESEN, 2011). Geralmente tem apresentação multisistêmica, com mecanismos patogênicos complexos. Esta doença configura um significativo problema de saúde pública, em virtude do seu potencial para desenvolver várias complicações médicas e nutricionais, podendo comprometer o crescimento e desenvolvimento das crianças (GIBBONS et al., 2012).

O diagnóstico da APLV é difícil de ser obtido em virtude da diversidade de manifestações clínicas, com sintomas inespecíficos, principalmente quando acomete o trato gastrointestinal. Atualmente, o conhecimento sobre o processo patogênico envolvido nas diferentes apresentações clínicas da APLV e sua real prevalência é limitado (MARTORELL-ARAGONÉS et al., 2015). Da mesma forma, o tratamento também é limitado em virtude das poucas informações disponíveis, sendo estabelecido como padrão a exclusão das proteínas do leite de vaca da dieta da criança por período variável, e o prolongamento desse tratamento também pode trazer prejuízos a saúde da criança como déficit de crescimento e desnutrição energético-proteica, principalmente quando não é utilizada uma fórmula substituta adequada (HOST; HALKEN, 2014).

A complexidade da APLV é observada tanto no espectro das apresentações clínicas como na sua história natural, e nos fatores que podem estar implicados no seu desenvolvimento (CRITTENDEN; BENNETT, 2005). Acredita-se que há uma sobreposição de fatores na etiologia dessa doença, incluindo as características genéticas do indivíduo e a interação com o ambiente (HOST; HALKEN, 2014).

Em relação aos fatores ambientais, destaca-se nos últimos anos o volume crescente de publicações pontuando as ações não clássicas da vitamina D, e uma delas seria a modulação da resposta imune, através da interação com seus receptores que estão presentes em células do sistema imunológico, atuando tanto sobre a imunidade inata como a adaptativa, podendo ter um papel na gênese das alergias alimentares (SUAINI et al., 2015; WEY; CHRISTAKOS, 2015; MIRZAKHANI et al., 2014; BAEKE et al., 2010).

Contudo, muitos estudos ainda são necessários para identificar o real papel de cada fator na etiologia das alergias alimentares. Alguns pesquisadores têm estudado polimorfismos de genes relacionados com essas enfermidades. No entanto, muito pouco foi estudado até o momento sobre polimorfismos nos genes envolvidos nas respostas imunológicas da APLV. Esse tipo de estudo traz novas informações que podem contribuir para aumentar o entendimento sobre a patogênese da doença.

Durante a minha prática de nutricionista, acompanhei crianças com APLV e constatee a dificuldade no manejo dietético desses pacientes, em virtude da variedade de sintomas e potenciais repercussões nutricionais como má evolução pômdero-estatural e deficiência de nutrientes específicos. Além disso, a história natural pode variar de acordo com a apresentação fenotípica, que em alguns casos pode perdurar por mais tempo que o esperado, o que me fez refletir se a genética poderia influenciar tanto o desenvolvimento da APLV como a sua evolução nesses pacientes.

No ano de 2012, ao ser admitida no Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, fui convidada a participar do projeto de pesquisa idealizado pela Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Eugênia Farias Almeida Motta, visando investigar a ocorrência de polimorfismos genéticos em crianças com APLV. Essa pesquisa foi inserida na área de concentração Abordagens Quantitativas em Saúde, e na linha de pesquisa Avaliação bioquímica, molecular, sensório-motora e nutricional das doenças gastrintestinais orgânicas e funcionais, do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal de Pernambuco, sob orientação atual do Prof.<sup>o</sup> Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho. A pesquisa foi submetida ao Edital Universal do CNPq, foi aprovada e financiada (número do processo: 488488/2013-3).

Essa pesquisa foi desenhada para responder a seguinte **pergunta condutora**: A frequência de polimorfismos nos genes das citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ 1), inflamatória (IL-4) e no gene do receptor de vitamina D difere em crianças com e sem APLV?

A **hipótese** formulada é que crianças com APLV podem apresentar maior frequência de polimorfismos nos genes de citocinas relacionadas com a tolerância oral. Da mesma forma, pode existir maior frequência de polimorfismos em genes relacionados com a resposta imune do tipo Th2 e no gene do receptor de vitamina D, o que pode estar associado ao desenvolvimento da APLV.

Para responder a pergunta condutora e corroborar ou recusar a hipótese formulada foi estipulado como **objetivo geral**: analisar a frequência de polimorfismos nos genes das citocinas regulatórias (TGF- $\beta$ 1 e IL-10), inflamatória (IL-4) e no gene do receptor de vitamina D em crianças com e sem alergia às proteínas do leite de vaca.

Para subsidiar o objetivo geral, foram construídos os seguintes **objetivos específicos**:

- 1) Determinar a frequência dos polimorfismos no gene TGF- $\beta$ 1, IL-10 e dos haplótipos do gene IL-10 (-1082/-819/-592) de acordo com as apresentações fenotípicas da alergia às proteínas do leite de vaca;
- 2) Determinar a frequência de polimorfismos no gene de citocina envolvida na resposta imune do tipo Th2 (IL-4), no gene do seu receptor (IL-4R), e no gene do receptor de vitamina D nas posições Fok I e Taq I, de acordo com as apresentações fenotípicas da alergia às proteínas do leite de vaca;
- 3) Analisar as características clínicas das crianças com alergia às proteínas do leite de vaca, de acordo com as apresentações fenotípicas e os fatores associados ao seu desenvolvimento.

A tese intitulada “*Polimorfismos dos genes das citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ 1), inflamatória (IL-4) e do receptor de vitamina D em relação aos fenótipos clínicos da alergia às proteínas do leite de vaca*” está estruturada em capítulos. O primeiro capítulo é constituído pela **revisão da literatura**, construído para fundamentar a base teórica e empírica deste trabalho, abordando a magnitude, as apresentações fenotípicas, mecanismo imunológico e história natural da APLV. Também são abordados conceitos de polimorfismos genéticos e a relação entre os polimorfismos das citocinas regulatórias, inflamatória e do receptor de vitamina D nas alergias alimentares.

O segundo capítulo é composto pela descrição dos **métodos** utilizados no planejamento, operacionalização do estudo e análise dos dados encontrados, com descrições detalhadas para permitir ao leitor analisar e reproduzir a pesquisa com precisão.

O terceiro capítulo descreve os **resultados** da tese, estruturados em:

- 1) Caracterização geral da amostra;
- 2) Polimorfismos dos genes das citocinas regulatórias (TGF- $\beta$ 1 e IL-10);
- 3) Polimorfismos dos genes IL-4 e IL-4R;

- 4) Polimorfismos do gene do receptor de vitamina D;
- 5) Características das crianças com APLV;
- 6) Análise multivariada.

O quarto capítulo é constituído da **discussão** dos resultados encontrados, dialogando com resultados de outras pesquisas científicas acerca do tema.

O quinto capítulo apresenta a **conclusão** da tese e as **considerações finais**.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Introdução

O leite de vaca na maioria das vezes é o primeiro antígeno alimentar que as crianças são expostas (SACKESSEN et al., 2011). Essa exposição desencadeia uma resposta imunológica que, quase sempre, conduz a tolerância oral. No entanto, em alguns casos, pode desencadear um quadro de APLV (SAVILAHTI; SAVILAHTI, 2013). A APLV é definida como uma reação adversa imunologicamente mediada (SICHERER; SAMPSON, 2010), em que o sistema imune reage a uma ou mais proteínas do leite, ocasionando danos ao organismo devido à resposta inflamatória exacerbada (JO et al., 2014; CRITTENDEN; BENNETT, 2005).

Entre as proteínas do leite de vaca, a caseína corresponde a 80% do total de proteínas, e inclui as frações  $\alpha$ 1-caseína,  $\alpha$ 2-caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína. Os 20% restantes são compostas pelas proteínas do soro do leite, que contém  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, lactoferrina, albumina e imunoglobulina bovina. A caseína,  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina são consideradas como as proteínas do leite de vaca mais alergênicas, sendo responsáveis pela sensibilização de mais de 50% dos pacientes (TSABOURI; DOUROS; PRIFTIS, 2014).

Em crianças com APLV, os sintomas geralmente se manifestam quando é introduzida fórmula infantil a base de leite de vaca na alimentação, como alternativa para complementar o aleitamento materno ou quando este é interrompido. Da mesma forma, os sintomas podem ser desencadeados após o consumo de alimentos contendo leite de vaca em sua preparação como as papinhas, na fase de alimentação complementar. É documentado que, em alguns casos, as crianças manifestam sintomas de forma imediata ou até mesmo semanas após a introdução da fórmula infantil, principalmente nos casos de reações predominantemente gastrintestinais (HOST; HALKEN, 2014). No entanto, a criança pode manifestar sintomas de APLV mesmo em aleitamento materno exclusivo (JÄRVINEN; SUOMALAINEN, 2001). Esses fatos explicam a maior incidência de APLV no primeiro ano de vida e, apenas em casos excepcionais se manifesta após dois anos de idade (MARTORELL-ARAGONÉS et al., 2015).

A prevalência da APLV é variável, a maior parte dos estudos é realizada em países desenvolvidos, nos quais acomete aproximadamente 2% a 3% das crianças no primeiro ano de

vida (LIFSCHITZ; SZAJEWSKA, 2015; HOST, 2002). Quando são consideradas as manifestações mediadas e não mediadas por IgE, pode corresponder a até 2,5% da população infantil, representando um quinto de todas as alergias alimentares da infância (SAVAGE; JOHNS, 2015). A prevalência estimada de APLV em escolares e adolescentes é de 0,3% e em adultos é inferior a 0,5% (FIOCCHI et al., 2010).

A falta de padronização de protocolos de estudos clínicos sobre alergias alimentares dificulta a estimativa de tendência em âmbito mundial (SACKESEN et al., 2011). Porém, sugere-se que a prevalência vem aumentando nas últimas décadas. Schoemaker et al. (2015) afirmam que é difícil determinar a verdadeira prevalência de APLV, devido a heterogeneidade de apresentações clínicas e critérios diagnósticos utilizados.

No Brasil, ainda não existem dados sobre a prevalência populacional de APLV. No entanto, pode ser destacado um estudo observacional, realizado com 9.478 crianças avaliadas por 30 pediatras gastroenterologistas em cinco regiões geográficas diferentes. Destas, 7,3% apresentaram como motivo da consulta sintomas sugestivos de alergia alimentar, 77% atribuídos ao leite de vaca. A análise de casos novos e em acompanhamento possibilitou que fosse estimada a incidência em 2,2% e a prevalência em 5,4% de pacientes com diagnóstico confirmado ou ainda para confirmação de APLV (VIEIRA et al., 2010).

Foi apontado que a percepção de alergia a leite pelos familiares é muito maior que a APLV confirmada por teste diagnóstico (FIOCCHI et al., 2010). Em estudo realizado em Pernambuco, em um hospital universitário, das 65 crianças avaliadas com sintomas sugestivos de APLV, em 46,8% dos casos o teste de provocação oral aberto não confirmou o diagnóstico (LINS et al., 2010).

Segundo Lifschitz e Szajewska (2015), a APLV é superdiagnosticada em muitos casos, mas também é subdiagnosticada em outros, principalmente quando não são utilizados métodos padronizados de diagnóstico. Nos casos em que a criança apresenta quadro sugestivo de APLV, é indicada a implementação de dieta de exclusão de proteínas do leite por até quatro semanas, em seguida deve ser realizado o teste de provocação oral (TPO) para confirmar ou descartar o diagnóstico (KOLETZKO et al., 2012). O teste duplo-cego placebo controlado (TDCPC) com leite de vaca é considerado padrão ouro para estabelecer o diagnóstico bem como identificar a aquisição de tolerância às proteínas do leite. No entanto, é pouco realizado na prática clínica pelo custo elevado e pela dificuldade operacional (FIOCCHI et al., 2010; BOYCE et al., 2010; NIGGEMANN; BEYER, 2007).



Uma vez diagnosticado com APLV, a base do tratamento consiste em dieta de exclusão de leite de vaca e derivados e utilização de fórmula especial contendo proteína extensamente hidrolisada ou a base de aminoácidos para aqueles com quadros mais graves de APLV e para as crianças com alto risco de anafilaxia. Por outro lado, para crianças em aleitamento materno exclusivo, é necessário o controle da dieta da mãe, com exclusão das proteínas do leite de vaca e a continuação do aleitamento materno deve ser estimulada (KOLETZKO et al., 2012; DE GREEF et al., 2012; FIOCCHI et al., 2010).

O tratamento dietético adequado permite o suporte necessário para o crescimento e desenvolvimento normal da criança com APLV. De forma contrária, a dieta de exclusão de leite de vaca e derivados prescrita inadequadamente, a exemplo uma criança não alérgica, ou prescrita por tempo prolongado para aquela que já desenvolveu tolerância ao leite pode prejudicar o seu crescimento, trazer prejuízos a sua qualidade de vida e da família, além de induzir a custos desnecessários (KOLETZKO et al., 2012).

Assim, compreender melhor as manifestações clínicas, a história natural e os fatores que podem estar implicados na gênese de desordens como a APLV são primordiais. Esta revisão da literatura tem como objetivo analisar alguns aspectos relacionados à interação entre a natureza e o ambiente, com foco nos polimorfismos genéticos, mecanismos patogênicos dos principais fenótipos clínicos da APLV e o papel da quebra da tolerância oral nesse processo. Considerando a escassez de estudos sobre polimorfismos genéticos em pacientes com APLV e seus mecanismos patogênicos, serão revistos estudos relacionados a sensibilização/alergia alimentar, pontuando sempre que possível, os estudos sobre APLV.

## **2.2 Alergia alimentar: Natureza vs Ambiente**

Nas últimas décadas cresceu o interesse no estudo do componente genético em uma ampla variedade de doenças, algumas das quais podem ser monogênicas na sua transmissão e, portanto, aderem aos princípios mendelianos. Outras doenças são complexas, como as alergias alimentares, e muitos genes podem estar implicados na sua patogênese. Os estudos de associação têm sido realizados nessa área buscando elucidar os principais genes que podem conferir maior suscetibilidade a doença. A identificação de múltiplos *locus* gênicos e a interação entre eles representam um desafio considerável (NOVANOVIC et al., 2010).

Algumas evidências da relação entre a hereditariedade e a ocorrência de doenças advêm de estudos como os que avaliam a história familiar de atopia. A atopia é usualmente definida como ocorrência de asma, dermatite atópica ou rinite alérgica em um ou mais parentes de primeiro grau e é considerada como um fator de risco para alergias alimentares e outras doenças alérgicas (LEE; KIM, 2016; DOGRUEL et al., 2016; KOPLIN et al., 2013; TAN et al., 2011; SAARINEN et al., 2005; CASOLARO et al., 1996). O risco para alergia alimentar pode ser aumentado de duas a dez vezes se a história familiar de atopia estiver presente (LI; MAGGADOTTIR; HAKONARSON, 2016).

Segundo Koplin et al. (2013) é importante compreender a relação entre a história familiar de atopia e alergia alimentar para identificar as crianças que possuem maior risco. Dessa forma, poderiam ser criadas medidas direcionadas para os grupos classificados como de risco visando a prevenção da alergia alimentar.

Em um estudo realizado com 581 famílias, se observou uma forte agregação familiar para alergias alimentares, quando se avaliou mãe-filho, pai-filho e principalmente entre irmãos (TSAI et al., 2009). Em um estudo com 58 pares de gêmeos foi encontrada diferença significativa na taxa de concordância para alergia a amendoim entre os gêmeos homozigóticos (64,3%) e dizigóticos (6,8%). Nesta população, a hereditariedade para alergia a amendoim foi estimada em 81,6%, sendo sugerido que existe uma forte influencia do componente genético nesta doença alérgica (SICHERER et al., 2000).

A presença de agregados familiares sugere que fatores genéticos contribuem para explicar a gênese do problema. Por outro lado, segundo Koplin; Mills e Allen (2015), as evidências científicas advindas dos estudos de agregação familiar são limitadas e insuficientes para caracterizar o real papel da genética no desenvolvimento das alergias alimentares, tendo em vista que a prevalência tem aumentado rapidamente nas últimas décadas, o que não pode ser explicado por mutações genéticas, sugerindo que fatores ambientais possam ter um papel fundamental nessas mudanças.

Estudos atuais vêm sugerindo que a regulação epigenética pode desempenhar um papel crítico no desenvolvimento de doenças alérgicas, incluindo as alergias alimentares (HONG; WANG, 2014). A epigenética pode ser descrita como a “ponte” entre o genótipo e o fenótipo, identificada como um fenômeno que altera o resultado final de um *locus* cromossômico, sem alterar a sequência de DNA (ácido desoxirribonucleico) subjacente, além de ser passada a próxima geração (GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007).

A maior parte dos fatores ambientais implicados no desenvolvimento de doenças alérgicas (incluindo a exposição microbiana, fatores nutricionais, fumo e outros poluentes) influencia a função imune fetal durante a gravidez e contribui para um risco aumentado de doença alérgica subsequente. Esses fatores têm sido associados com efeitos epigenéticos, modificando a programação imunológica, ativando ou silenciando genes relacionados ao sistema imunológico (PRESCOTT; SAFFERY, 2011).

Foi demonstrado que a diferenciação de linfócitos T está sob controle epigenético através de mudanças na metilação de DNA e de histonas e/ou acetilação de histonas, o que provê marcada plasticidade no desenvolvimento de células T, regulando a diferenciação de linfócitos T *helper* (Th) virgens para um perfil Th1, Th2 ou T regulador (Treg). Em adição, a promoção da metilação é considerada como um pré-requisito para a expressão do fator de transcrição FoxP3 (do inglês: *Forkhead box P3*) e diferenciação de células Treg (MARTINO; PRESCOTT, 2010). Estudos recentes, avaliando crianças com alergias alimentares encontraram metilação diferenciada no DNA de genes relacionados com a diferenciação de células T e com o equilíbrio entre as populações de células Th1/Th2, sugerindo que esse mecanismo epigenético em período crítico da vida pode ser implicado na gênese de alergias alimentares (CANANI et al., 2015; MARTINO et al., 2014).

Em estudo realizado com 40 crianças (10 com APLV mediada por imunoglobulina E (IgE) ativa, 20 que adquiriram tolerância ao leite de vaca e 10 controles) foi avaliada a metilação do DNA da região promotora do gene das citocinas interleucina (IL)-4, IL-5, IL-10 e interferon gama (INF- $\gamma$ ). Observou-se que a metilação do DNA do gene da IL-4 e IL-5 foi significativamente menor e da IL-10 e INF- $\gamma$  foi maior em crianças com APLV ativa, em comparação aos controles. As crianças com evidência de recente aquisição de tolerância oral apresentaram uma metilação diferente, este perfil era semelhante, mas não idêntico ao observado nos controles saudáveis. Os autores sugerem que a aquisição de tolerância foi caracterizada por um padrão distinto de metilação do DNA em genes de citocinas Th1 e Th2 (CANANI et al., 2015).

Portanto, há um reconhecimento crescente de que as modificações epigenéticas são críticas para o desenvolvimento humano normal e desempenham um papel importante em doenças complexas. No entanto, os mecanismos epigenéticos que afetam a programação imune e causam alergia alimentar ainda são amplamente inexplorados (QUAKE; NADEAU, 2015). A epigenética representa uma área promissora de conhecimentos no campo da alergia alimentar. Tendo em vista o início dos sintomas de alergias alimentares surgirem em fase precoce da vida,

os estudos com ênfase nos mecanismos epigenéticos podem melhorar o entendimento sobre as interações gene-ambiente e os mecanismos biológicos subjacentes durante as janelas críticas de desenvolvimento da criança (QUAKE; NADEAU, 2015; HONG; WANG, 2014).

Segundo Uitterlinden et al. (2004), estudos genéticos proporcionam excelentes oportunidades de vincular conhecimentos moleculares com dados epidemiológicos, o que justifica o maior interesse nessa área. Muitos estudos genéticos avaliam o efeito de genes isolados ou a interação entre vários genes no desenvolvimento das doenças alérgicas, tomando como base a identificação de polimorfismos em *loci* gênico específico e esse campo também é considerado como promissor (LI; MAGGADOTTIR; HAKONARSON, 2016).

É provável que a suscetibilidade para doenças alérgicas resulte da herança de muitos genes. As pesquisas de base genética permitem associar os genes mutantes e os seus produtos anormais a fenótipos clínicos e têm contribuído para aumentar a compreensão sobre os fatores genéticos subjacentes nas alergias alimentares (HOLLOWAY et al., 2010).

### 2.2.1 Polimorfismos genéticos

Polimorfismo de nucleotídeo único ou SNP (do inglês: *Single Nucleotide Polymorphisms*) é definido como a substituição de um único par de bases em uma sequência de nucleotídeos do DNA (BALASUBRAMANIAN et al., 2004). É a forma mais comum de polimorfismo genético, podendo ocorrer com uma frequência tão elevada quanto um em cada 500 a 1000 pares de bases, levando a um total de muitos milhões de SNPs na população global (SRIPICHAI; FUCHAROEN, 2007). O SNP tem duas formas alternativas chamadas de alelos, que podem conter diferentes informações de um *loci* específico dentro de um gene. Em uma população, o alelo que apresenta menor frequência é chamado de “alelo menor” ou “alelo raro”, e pode variar entre populações. Da mesma forma, o alelo com maior frequência é chamado de “alelo selvagem” ou “alelo normal” de uma população específica (REID-LOMBARDO; PETERSON, 2010).

Os SNPs podem ter uma ampla variedade de efeitos, a depender do local, podendo não apenas influenciar na estrutura e/ou estabilidade da proteína, mas até (se localizado em um domínio importante para a proteína) interferir em interações proteína-proteína ou na sua

atividade e assim, interromper vias importantes de ação (BALASUBRAMANIAN et al., 2004). Os SNPs são úteis porque apresentam elevada frequência, podendo atuar como marcadores biológicos, uma vez que são transmitidos junto a outros genes associados a doenças, que estão localizados na região próxima a eles, fenômeno conhecido como “ligação” ou “*linkage*” (ROCHA et al., 2007).

O estudo dos polimorfismos tem se tornado cada vez mais frequente, buscando aumentar o entendimento sobre o papel e a relevância da variabilidade genética para a saúde, tendo em vista que em doenças complexas, esses polimorfismos podem tanto ser neutros como aumentar a suscetibilidade à doença, gravidade da doença, influenciar na resposta ao tratamento ou até mesmo apresentar um papel protetor (WILLIAMS et al., 2011).

O impacto de fatores genéticos sobre a patogênese de doenças alérgicas é atualmente uma área de intensa investigação. Algumas dessas pesquisas têm focado no papel das citocinas envolvidas na resposta imune Th1, Th2 e Treg e têm relacionado as diferenças nos níveis (altos ou baixos) dessas citocinas a variações alélicas nos genes que codificam a sua produção, indicando que esses polimorfismos genéticos podem desempenhar um importante papel na fisiopatologia dessas doenças (TRIFUNOVIC et al., 2015). Além disso, estudos genéticos em doenças alérgicas podem contribuir para o aprimoramento do tratamento, individualizando-o de acordo com o genótipo específico, visando melhorar os resultados terapêuticos e minimizar efeitos adversos (ORTIZ; BARNES, 2015).

#### **2.2.1.1 Polimorfismos dos genes da IL-10 e TGF- $\beta$ 1**

As citocinas IL-10 e Fator Transformador de Crescimento beta ou TGF- $\beta$  (do inglês: *Transforming Growth Factor- $\beta$* ) apresentam uma variedade de propriedades e atividades pleiotrópicas em diferentes células, desempenhando um papel regulador, principalmente no tocante a supressão da resposta imune (COMMINS; STEINKE; BORISH, 2008; MOSSER; ZHANG, 2008; WAN; FLAVELL, 2007). A variabilidade no gene dessas citocinas pode modificar sua expressão e influenciar sua produção, podendo ser associado ao desenvolvimento e/ou gravidade de doenças relacionadas com o sistema imune (PANEK et al., 2014; LESIAK et al., 2013; KINGO et al., 2003). A diminuição da produção dessas citocinas pode contribuir para o aumento da inflamação, como ocorre nas doenças alérgicas, e pode ter início em fase inicial da vida, quando o sistema imune ainda está em maturação (RAEDLER et al., 2013).

O gene do TGF- $\beta$ 1 é localizado no cromossomo 19, na posição 19q13.2 e muitos polimorfismos foram encontrados nesse *locus* gênico (ACEVEDO et al., 2010). Foi observado que a troca de base nucleotídica na sequência do DNA (C  $\rightarrow$  T), no início da região promotora do gene, na posição -509C/T, foi associada com regulação negativa da transcrição da proteína (HOBBS et al., 1998). Da mesma forma, em estudo realizado com 38 indivíduos alérgicos e 25 controles, a presença de homozigose para o alelo menor T (TT) na posição -509 do gene TGF- $\beta$ 1 foi associada com maior risco para alergia (MENG et al., 2005).

O gene que codifica a síntese de IL-10 está localizado no cromossomo 1, na posição 1q32.1, constituído de quatro íntrons e cinco éxons, e codifica uma proteína com 178 aminoácidos. Os polimorfismos localizados na região promotora do gene da IL-10 têm sido mais estudados até agora, com pelo menos 23 SNPs diferentes identificados (BOCŞAN; MUNTEAN; BUZOIANU, 2015). A região promotora proximal contém três SNPs de interesse, nas posições -1082 G/A, -819C/T e -592C/A, pois estão em estreita proximidade com vários fatores de transcrição, podendo interferir na transcrição do gene (REES et al., 2002). A figura 1 apresenta a estrutura do gene da IL-10.

Estima-se que 50% a 75% das variações na síntese da IL-10 é atribuída a fatores genéticos (REUSS et al., 2002). O polimorfismo da região -1082 tem sido extensivamente estudado e parece ter um importante papel na modulação da produção da citocina (BOCŞAN; MUNTEAN; BUZOIANU, 2015).

O estudo dos polimorfismos no gene IL-10 e a sua relação com os seus níveis séricos se mostraram relevantes, pois tanto a superprodução como a deficiência, resultantes de genótipos específicos, podem acarretar em lesões potenciais. A superprodução da IL-10 pode acarretar em aumento da susceptibilidade a infecções virais. Por outro lado, a deficiência da IL-10 determina a exacerbação da resposta inflamatória, podendo conduzir ao desenvolvimento de doenças auto-imunes ou outras condições alérgicas como as alergias alimentares (BOCŞAN; MUNTEAN; BUZOIANU, 2015; HAWRYLOWICZ, 2005).

Foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* que variações na região promotora do gene da IL-10 alteram a expressão da proteína e, conseqüentemente, a produção de IL-10 (KINGO et al., 2003). O polimorfismo na posição -592 é indicado como regulador da expressão da IL-10 (KARIMABAD et al., 2013).

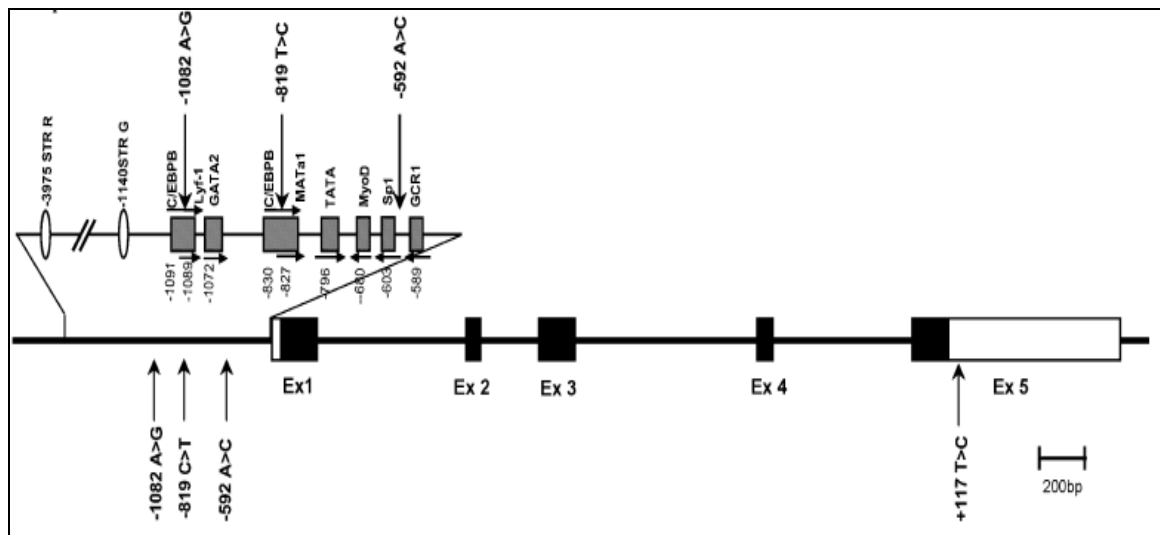
Foi identificado que os SNP -819 e -592 ocorrem em forte desequilíbrio de ligação com o polimorfismo -1082, o que torna interessante o estudo dos haplótipos formados a partir dos

genótipos deles. Geralmente, três haplótipos existem em populações caucasianas (GCC, ACC e ATA), um quarto haplótipo foi encontrado, mas é extremamente raro (GTA) (ESKDALE et al., 1999). O estudo da frequência desses haplótipos mostrou que eles foram associados aos níveis de IL-10 (CRAWLEY et al., 1999).

A presença de polimorfismos na região promotora do gene da IL-10 tem sido associada a doenças atópicas (CHATTERJEE et al., 2005; LYON et al., 2004, HOBBS et al., 1998). Polimorfismos da região promotora da IL-10 também têm sido associados aos níveis de IgE em crianças com alergia alimentar (NEGORO et al., 2006).

Os estudos avaliando a relação de polimorfismos no gene da IL-10 e alergias alimentares ainda são escassos, principalmente nos casos de alergias alimentares não mediadas por IgE. Da mesma forma, muito pouco foi explorado em relação aos polimorfismos do gene do TGF- $\beta$ 1 e o desenvolvimento de alergias alimentares, e os estudos prévios falharam em encontrar esta associação.

**FIGURA 1** – Representação esquemática da estrutura do gene IL-10



Nota: Éxons codificantes são marcados por blocos sombreados e, 5'URT e 3'URT são marcados por blocos brancos. Locais de fatores de transcrição estão indicados

Fonte: SHIN et al., 2005.

### 2.2.1.2 Polimorfismos do gene IL-4 e seu receptor

A IL-4 desempenha um papel importante na síntese de IgE por estimular células Th virgens a se diferenciarem para um perfil de células Th2, que por sua vez desencadeia a mudança isotípica de IgM/IgG para IgE em células B (GEHA, 1992). Além disso, a IL-4 pode ativar várias células da linhagem mielóide, incluindo macrófagos, eosinófilos e células dendríticas (VAN DYKEN; LOCKSLEY, 2013).

Os efeitos da IL-4 dependem da ligação e sinalização ao seu receptor (IL-4R), que consiste em um complexo composto pela cadeia alfa ( $\alpha$ ) e cadeia gama comum ( $\gamma_c$ ), resultando numa série de acontecimentos de fosforilação mediada por cinases associadas ao receptor. Por sua vez, estes causam o recrutamento de mediadores do crescimento celular, da resistência a apoptose, ativação de genes e diferenciação celular (NELMS et al., 1999). Dessa forma, o estudo de polimorfismos nos genes da IL-4 e IL-4R se tornaram de interesse devido ao potencial em alterar a expressão da IL-4 e, consequentemente, influenciar os níveis de IgE e a resposta inflamatória alérgica (MARSH et al., 1994).

O gene IL-4 é localizado no cromossomo 5, na posição 5q31.1. A substituição da base nucleotídica (C→T) na posição -590, na região promotora do gene foi associada à expressão aumentada do gene *in vitro* e a maiores níveis de IgE *in vivo*. Esse polimorfismo está presente em, aproximadamente, 27% dos caucasianos. Por outro lado, o gene IL-4R está localizado no cromossomo 16, no *locus* 16p12.1, uma região ligada a aumento de resposta de IgE (FARIA et al., 2008).

Em crianças canadenses, o alelo T para a região promotora do gene IL-4 foi associada um risco quatro vezes maior para asma e o genótipo TT foi associado a um risco duas vezes maior de desenvolver rinite alérgica aos 12 meses de idade (ZHU et al., 2000). O gene IL-4R $\alpha$  foi associado a maior chance de sibilância e sensibilização aos quatro anos de idade, sendo sugerido que esse gene possa desempenhar uma maior influência na suscetibilidade para atopia na infância (MELÉN et al., 2006).

O polimorfismo único funcional na região promotora do gene da IL-4 foi associado aos níveis séricos de IL-4 e IgE em crianças asmáticas (HUANG; ZHONG; WU, 2012). Por outro lado, em estudo realizado com crianças e adolescentes atópicas, os polimorfismos do gene IL-4 -590 e IL-4R não foram associados à severidade da asma (FARIA et al., 2008).



No entanto, Narozna et al. (2016) avaliaram polimorfismos nos genes IL-4, IL-4R $\alpha$  e IL-13 em crianças asmáticas polonesas e controles saudáveis. Os polimorfismos no gene IL-4R $\alpha$  foram associados a maior risco de alergia, asma leve e dermatite atópica, enquanto os polimorfismos no gene IL-4 (-590) foram associados a atopia clínica, mas não foram associados aos níveis de IgE. Em estudo realizado por Kayserova et al. (2012), foi encontrada associação entre o polimorfismo -590 (C/T) no gene da IL-4 e o diagnóstico da dermatite atópica. Em adição, o polimorfismo no gene do IL-4R foi associado a alergia respiratória entre as crianças com dermatite.

Liu et al. (2011) realizaram um estudo com 649 crianças e avaliaram 11 SNP envolvidos na produção de IgE, incluindo o polimorfismo da IL-4 -590, e polimorfismos relacionados com os níveis de vitamina D. Os autores observaram que a presença do genótipo CC para o gene da IL-4 -590 em crianças com deficiência de vitamina D aumentou o risco para sensibilização alimentar, indicando uma possível interação aditiva.

Estudos de associação entre os genes IL-4 e IL-4R estão sendo desenvolvidos mais extensivamente em pacientes atópicos, no entanto, em pacientes com alergias alimentares, principalmente na APLV ainda são pouco explorados (BROWN et al., 2012; LIU et al., 2011; NEGORO et al., 2006).

### **2.2.1.3 Polimorfismos do gene do receptor de vitamina D**

Estudos de associação genética têm sido desenvolvidos para estudar a relação entre a vitamina D e o desenvolvimento de doenças alérgicas. Muitos destes estudos são voltados para o gene do receptor de vitamina D ou VDR (do inglês: *vitamin D receptor*), pois estão amplamente distribuídos pelo corpo, inclusive em células do sistema imunológico, e o polimorfismo desse gene poderia ter efeitos sobre as ações biológicas dessa vitamina, incluindo a regulação da resposta imune (VALDIVIELSO; FERNANDEZ, 2006).

O gene VDR é localizado no cromossomo 12, na posição 12q13.1. A análise da organização genômica do *locus* VDR têm mostrado que esse é um gene bastante grande, pouco mais de 100kb, com uma vasta região promotora (UITTERLINDEN et al., 2004). Esse gene é

altamente polimórfico, porém quatro SNPs são mais estudados na literatura: Fok I (éxon 2), Bsm I, Apa I (íntron 8) e Taq I (éxon 9). A figura 2 apresenta a estrutura do gene VDR.

Entre os polimorfismos do gene VDR, o SNP Fok I, na região de início da tradução, é o único que pode resultar em uma proteína VDR com uma estrutura diferente, em decorrência da troca da base nucleotídica (T→C) na sequência de bases do gene (ATG para ACG) no primeiro de dois locais potenciais de iniciação de tradução no éxon 2. Indivíduos com o alelo C, designado F (alelo variante) iniciam a tradução no segundo sítio ATG, resultando em uma proteína mais curta, com três aminoácidos a menos (424 aminoácidos), denominada de F-VDR. Em contraste, indivíduos com o alelo T, designado f (alelo selvagem) iniciam a tradução, no primeiro local ATG e sintetizam o comprimento completo da proteína VDR (427 aminoácidos), denominada f-VDR (ZMUDA; CAULEY; FERRELL, 2000). O papel dessa mudança estrutural na função da proteína ainda está sendo estudada.

Estudos têm sido realizados avaliando a associação entre os polimorfismos do gene VDR Fok I e vários tipos de doenças, incluindo aquelas relacionadas com o sistema imune. Etten et al. (2007) avaliaram polimorfismos do gene VDR Fok I em estudo experimental com células do sistema imunológico de 28 indivíduos saudáveis. Foi observado que aqueles que possuíam genótipo homozigoto da proteína curta FF-VDR apresentavam elevada expressão de IL-12 em monócitos e células dendríticas, em comparação aos indivíduos com genótipo homozigoto para a proteína longa ff-VDR. Adicionalmente, os linfócitos daqueles com genótipo FF-VDR proliferaram mais fortemente em resposta a fitohemaglutinina, em comparação aos indivíduos com genótipo ff-VDR. Esses achados sugerem que o polimorfismo do gene VDR Fok I altera o comportamento de células do sistema imune.

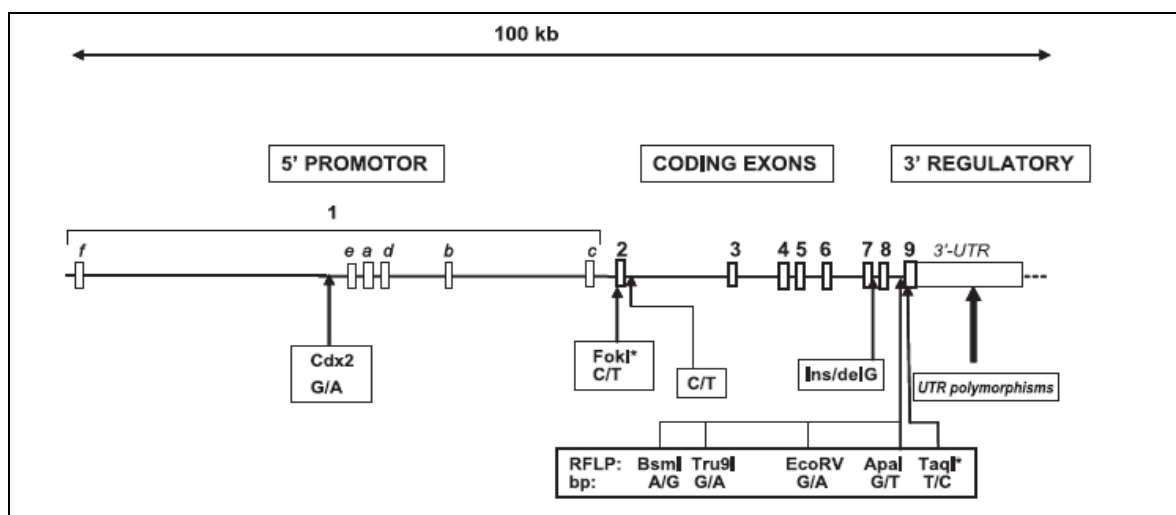
Outros estudos também avaliaram a relação entre os polimorfismos do gene VDR e seu possível efeito nos níveis séricos da vitamina D. Kitanaka et al. (2012) avaliaram 30 crianças com idade inferior a quatro anos com deficiência de vitamina D e 66 controles. Neste estudo encontrou-se uma diferença significativa na frequência alélica para o gene VDR nas posições Taq I, Apa I, Bsm I, NADSYN1 e GC entre os dois grupos estudados.

Segundo McGrath et al. (2010), é possível que as concentrações séricas de vitamina D possam variar de acordo com o genótipo do indivíduo. Os autores especulam que as curvas de associação em forma de U em relação aos níveis de vitamina D e o risco de doenças, já relatado em alguns estudos, possam refletir uma mistura de subgrupos de genótipos relacionados com o metabolismo da vitamina D.

Estudo avaliando a relação entre os polimorfismos dos genes relacionados com o metabolismo da vitamina D, dentre eles o gene VDR, e os níveis séricos da vitamina D também foi desenvolvido por Suaini et al. (2014), com 563 crianças com um ano de idade, provenientes de uma coorte de nascimento denominada HealthNuts, no qual avaliaram 28 SNPs em seis genes. Os autores não encontraram diferença significativa na distribuição genotípica para os SNPs do gene VDR Fok I e Taq I entre as crianças com e sem deficiência de vitamina D.

Os efeitos desses polimorfismos sobre o desenvolvimento de alergias alimentares ainda é pouco explorado.

**FIGURA 2** – Representação esquemática da estrutura do gene VDR.



Nota: \*Indica que esses polimorfismos estão em área codificadora

Fonte: UITTERLINDEN et al., 2004.

### 2.2.2 O papel imunomodulador da vitamina D

Os efeitos biológicos da vitamina D na sua forma ativa, a 1,25-dihidroxitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) ou calcitriol, são mediados pelos seus receptores, que estão presentes em uma ampla variedade de tecidos corporais (RYAN; ANDERSON; MORRIS, 2015). A 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> atravessa livremente a membrana celular e se liga ao VDR, formando um heterodímero com o receptor retinóide X. Em seguida, interage com sequências específicas de DNA da célula-alvo,

denominadas de elementos responsivos à vitamina D, na região promotora do gene, modulando a transcrição do gene (BIKLE, 2008).

A identificação de VDR em linfócitos atraiu o interesse para um possível papel na regulação do sistema imune (MIRZAKHAN et al., 2015; KAMEN; TANGPRICHA, 2010; CANTORNA et al., 2004). É conhecido que todos os tecidos do corpo possuem VDR, incluindo células do sistema imunológico como os linfócitos T e B ativados, neutrófilos e células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas (BAEKE et al., 2007; TAKAHASHI et al., 2002). A expressão dos VDR nestas células é controlada por sinalização imune. Enquanto células T virgens exibem níveis baixos desses receptores, em células T ativadas esses receptores são abundantes. Esses achados indicam que a vitamina D pode desempenhar um importante papel como modulador da resposta imunológica (BAEKE et al., 2010).

A vitamina D foi apontada como um importante mediador da resposta imune inata, aumentando as propriedades antimicrobianas de células como monócitos e macrófagos, com aumento da quimiotaxia e atividade fagocitária (HEWISON, 2012). Também foi descoberto que a vitamina D induz a expressão da proteína antimicrobiana catelicina, peptídeo intracelular antimicrobiano da classe das defensinas, considerada como um elemento essencial da imunidade inata contra infecção viral e bacteriana. Ela é encontrada em lisossomos de neutrófilos, em células mielóides, células do epitélio bronquial, epitélio intestinal, queratinócitos e trofoblastos da placenta (WEI; CHRISTAKOS, 2015; ADAMS; HEWISON, 2008).

As células dendríticas foram reconhecidas como alvo central para  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , direcionando a resposta imune adaptativa (HEWISON, 2012). A vitamina D atua inibindo a maturação de células dendríticas e, dessa forma, promove um fenótipo tolerogênico, sendo mais pronunciada em células dendríticas mielóides. Esse efeito é refletido pela inibição da expressão do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) de classe II, de moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86) e outros marcadores na superfície das células dendríticas (SUAINI et al., 2015). Além disso, a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  também modula a produção e expressão das citocinas produzidas pelas células dendríticas, por inibir a produção de IL-12 e IL-23, citocinas conhecidas por direcionar a diferenciação das células Th virgens em Th1 e Th17, respectivamente, bem como a liberação das citocinas por elas expressadas (BAEKE et al., 2010). Portanto, a vitamina D contribui para a redução do dano aos tecidos associados com a

produção excessiva de células Th1 e Th17, desviando a resposta imune para um fenótipo Th2, com elevação da produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (HEWISON, 2012).

Enquanto os efeitos imunossupressores da vitamina D em células Th1 são claros, os seus efeitos sobre a expressão de citocinas Th2 são contraditórios e ainda precisam ser esclarecidos. Alguns estudos mostraram que a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  favorece células Th2 por hiperregular a expressão da transcrição específica dos fatores transcricionais GATA-3 e c-maf, bem como de IL-4 em ratos (BOONSTRA et al., 2001).

Por outro lado, é destacada a capacidade da vitamina D em induzir a tolerância por estimular a produção de células TregFoxP3<sup>+</sup> através do aumento da produção de IL-10 pelas células dendríticas (CHAMBERS; HAWRYLOWICZ, 2011).

A avaliação dos níveis de 25 hidroxivitamina D ( $25(\text{OH})\text{D}$ ), a forma circulante da vitamina, no cordão umbilical de recém-nascidos mostrou que os níveis de vitamina D ao nascimento estavam associados à proporção de células Treg CD25<sup>+</sup> que expressam FoxP3<sup>+</sup>. Sendo sugerido que os efeitos imunológicos dos níveis de vitamina D insuficientes no pré-natal têm potencial para afetar o risco de desenvolver alergia na infância (CHI et al., 2011).

Em experimento com linfócitos B ativados, a suplementação de vitamina D aumentou a expressão de IL-10 em mais de três vezes, tanto pelo recrutamento de VDR no gene promotor da IL-10, como por modulação de sinalizadores dependentes de cálcio, sugerindo que a vitamina D poderia ser utilizada como um modulador da resposta imune alérgica (HEINE et al., 2008).

De acordo com Hewinson (2012), as células T podem ser um alvo importante para os efeitos imunomoduladores da vitamina D de diferentes formas. Podem ser destacados quatro mecanismos potenciais pelos quais a vitamina D pode influenciar a função das células T: (i) efeitos diretos sobre as células T via  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sistêmico; (ii) efeitos indiretos sobre a apresentação de antígenos para células T mediada pelas células apresentadoras de antígenos que expressam CYP27B1 e sintetizam  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ; (iii) efeitos parácrinos diretos de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nas células T após a síntese da sua forma ativa pela enzima CYP27B1 por monócitos ou células dendríticas; (iv) conversão direta (intracrina) de  $25(\text{OH})\text{D}$  a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  por células T.

Experimentos também mostraram que a proliferação de células T e sua função é inibida por uma redução na produção de IL-2 em resposta a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . As células T tratadas diretamente com calcitriol ou seus análogos, na ausência de células apresentadoras de

antígenos, diminuiu a expressão de células Th1, Th9 e Th22, mas aumentou a produção de citocinas produzidas por células Th2 (SUAINI et al., 2015).

Muitos mecanismos foram postulados para explicar os efeitos da vitamina D sob a imunidade inata e adaptativa, como reduzir a inflamação, promover tolerância imune e aumentar a integridade do epitélio intestinal, mas os mecanismos da vitamina D que podem influenciar o risco de alergia alimentar não são claros (SUAINI et al., 2015). O que levou muitos pesquisadores a avaliarem a associação entre os níveis séricos de vitamina D e a prevalência de alergias alimentares e sensibilidade a alérgenos alimentares.

Os resultados de alguns estudos mostram que a vitamina D pode não apresentar uma resposta linear em relação ao desenvolvimento de alergia alimentar, sendo encontrada uma associação em forma de U, entre baixos e altos níveis de vitamina D com elevação da IgE sérica específica para alérgenos alimentares (ROTHERS et al., 2011; HYPPÖNEN et al., 2009).

Em estudo realizado por Weisse et al. (2013), os níveis séricos de vitamina D durante a gestação foram associados com níveis elevados de IgE específica para alimentos nas crianças aos dois anos de idade. Também foi observado que os níveis de vitamina D no cordão umbilical foram negativamente correlacionados com o número de células Treg. Sugerindo-se que elevados níveis de vitamina D na mãe ( $\geq 30\text{ng/mL}$ ) possam ter inibido a diferenciação de células Treg ao nascimento, podendo ter contribuído para maior risco de sensibilização/alergia alimentar.

Contrariamente, Allen et al. (2013) observaram que a insuficiência de vitamina D em crianças com um ano de idade aumentou a chance para ter múltiplas alergias alimentares ( $\geq 2$ ), sendo sugerido que a suficiência de vitamina D pode desempenhar um papel protetor contra a doença alérgica no início da vida. Achados similares foram encontrados por Sharief et al. (2011), ao avaliarem os resultados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (2005-2006). Os níveis de 25(OH)D  $< 15\text{ng/mL}$  foram associados com altos níveis de IgE específica para 11 dos 17 alérgenos testados em crianças e adolescentes americanos.

Foi hipotetizado por Wjst (2009), em um estudo epidemiológico, que a suplementação de vitamina D veiculada pelo óleo de fígado de bacalhau em cidades inglesas, para prevenir raquitismo, pode ter contribuído para o aumento da prevalência de doenças alérgicas. Essa hipótese ainda não foi confirmada, bem como a hipótese contrária, que a suplementação de vitamina D na infância poderia prevenir o desenvolvimento de doenças alérgicas. A *World*

*Allergy Organization* (WAO), após examinar as evidências atualmente disponíveis, não encontrou apoio para a hipótese de que a suplementação de vitamina D reduz o risco de desenvolvimento de doenças alérgicas em crianças. Por isso, a WAO não sugere a utilização de vitamina D em mulheres grávidas, lactantes ou crianças saudáveis como um meio de prevenir o desenvolvimento de doenças alérgicas (YEPES-NUÑEZ et al., 2016).

É importante destacar que embora muitos estudos experimentais tragam informações importantes acerca das ações da vitamina D no sistema imune, alguns achados são inconsistentes. Vale salientar também que muitos desses estudos são realizados em animais ou *in vitro*, e podem não refletir adequadamente as respostas da vitamina D em um ambiente fisiológico como o corpo humano. Da mesma forma, os resultados dos estudos abordando a relação entre a vitamina D e alergias alimentares se revelaram muitas vezes conflitantes ou inconsistentes, não permitindo ainda um consenso sobre o papel específico dessa vitamina no desenvolvimento de alergias alimentares (DELUCA, 2015; DELLA GIUSTINA et al., 2014). Porém, alguns achados indicam que pode haver uma interação entre a vitamina D e a genética do indivíduo no desenvolvimento das alergias alimentares (LIU et al., 2011).

### **2.2.3 Alergia alimentar: fatores associados**

O aumento epidêmico de doenças alérgicas e autoimunes, mais rápido do que poderiam ocorrer alterações no genoma humano, sugere uma susceptibilidade associada do sistema imune a modernas mudanças ambientais. Além disso, a expressão clínica de doença alérgica em fase precoce da vida reforça fortemente a hipótese que os eventos pré-natais e pós-natais muito precoces são susceptíveis para desempenhar um papel crítico na programação imunológica (PRESCOTT; ALLEN, 2011).

Fatores ambientais têm sido associados ao aumento de doenças alérgicas na infância, juntamente com evidências plausíveis de mecanismos imunológicos. Estes incluem poluentes ambientais, duração do aleitamento materno, tipo de parto, colonização microbiana, alimentação materna durante a gestação e da criança no primeiro ano de vida, incluindo a idade na introdução da alimentação complementar e período de introdução dos principais alérgenos alimentares. Além disso, atenção também tem sido dada a relação entre nutrientes específicos e o desenvolvimento de doenças alérgicas como a vitamina D, antioxidantes, ácido fólico e

ácidos graxos poli-insaturados (LEE; KIM, 2016; JENNINGS; PRESCOTT, 2010; ROBISON; KUMAR, 2010).

Outros fatores relacionados ao estilo de vida das sociedades modernas também estão sendo pontuados como o uso de antibióticos, melhora da purificação da água (com redução de infecções associadas), melhora da qualidade da alimentação (com redução da carga microbiana), maior imunização, redução do tamanho das famílias e obesidade. Esses fatores ambientais podem atuar separadamente ou em conjunto, contribuindo para a falha no desenvolvimento da tolerância imune no primeiro ano de vida, período em que as alergias alimentares geralmente se manifestam. No entanto, todos esses fatores ainda estão sob debate (ALLEN; MARTIN, 2010).

Segundo Tan et al. (2012), as exposições ambientais podem interagir com a predisposição genética para modificar o risco de doença e/ou seu resultado, que no caso das alergias alimentares poderia influenciar no desfecho clínico de tolerância.

É amplamente aceito na literatura que o ambiente pode contribuir para a gênese da APLV. Entre os fatores ambientais, a exposição precoce às proteínas do leite de vaca no período neonatal tem sido vista como um fator determinante (HOST; HALKEN, 2014). Esse fato foi documentado em uma grande coorte de nascimento (6.209 lactentes) acompanhada por 18 a 34 meses. Neste estudo, a alimentação complementar iniciada nos primeiros dois meses de vida com fórmula infantil aumentou o risco para APLV em comparação a complementação com leite materno pasteurizado e soro de leite hidrolisado (SAARINEN et al., 1999).

Segundo Host e Halcken (2014), a absorção de proteínas alimentares, como as proteínas do leite de vaca, através da mucosa intestinal é um fenômeno normal e a formação de anticorpos contra essas proteínas é uma resposta fisiológica. Porém, não está claro ainda se o aumento da absorção de macromoléculas é parte de uma predisposição alérgica ou é devido a uma lesão temporária da mucosa, embora a relevância do aumento da absorção para o desenvolvimento de condições clínicas como a APLV já está clara.

Em alguns casos, a sensibilização para as proteínas do leite de vaca pode ocorrer durante o aleitamento materno exclusivo, podendo ser atribuída à exposição a mínimas quantidades de proteínas do leite de vaca no leite materno (entre 0,9-150ng/mL). No entanto, especula-se que outros fatores estão mais relacionados como o contato com as mãos contaminadas com leite ou inalação de vapor do cozimento de alimentos contendo leite de vaca (HOST, 1994).



Em estudo realizado por Monjaraz et al. (2015) com 101 crianças com APLV e 90 controles, atendidos em Centro de Gastroenterologia e Nutrição do México, a prematuridade, a duração menor do aleitamento materno, com consequente introdução precoce de fórmula infantil e o uso de antibióticos no terceiro trimestre da gestação foram considerados como fatores de risco para o desenvolvimento da APLV.

O leite materno possui fatores imunomoduladores importantes na fase inicial da vida da criança, dentre esses se destaca o papel do TGF- $\beta$ 1, por ser responsável pela produção de IgA específica, inibição da ativação de células T e indução de tolerância oral (MINNITI et al., 2014). As concentrações dessa citocina são mais elevadas no colostro, em comparação ao leite maduro (HRDÝ et al., 2012; PROKESOVÁ et al., 2006). Postula-se que a IgA presente no leite materno, quer isoladamente ou como um complexo com antígenos secretados, pode desempenhar um papel protetor para alergias alimentares, por modular as respostas imunes da mucosa intestinal, limitando a quantidade de antígenos disponíveis (NOWAK-WĘGRZYN et al., 2015).

No leite humano também se destaca o papel da molécula CD14 solúvel. É um receptor de reconhecimento padrão de lipopolissacárideo, que se liga a componentes microbianos, iniciando a secreção de níveis elevados de IL-12, portanto, possui um papel importante no desenvolvimento da imunidade inata (SOHI; WARNER, 2008). Essa molécula está presente em grandes quantidades no leite humano, o que sugere que esta citocina possa desempenhar um papel adjuvante no efeito protetor da amamentação no desenvolvimento da alergia (MAVROUDI; XINIAS, 2011).

Segundo Björkstén (2005), a mãe é o principal fator ambiental ao qual a criança está em contato direto, tanto na fase gestacional como nos meses subsequentes, durante a amamentação. Estudos relatam que a exposição às bactérias da mãe durante o parto influencia no tipo de bactérias que colonizam o intestino da criança; essas bactérias apresentam papel ativo na maturação do intestino e influenciam o sistema imunológico local (TSABOURI et al., 2014; CAO; FEEHLEY; NAGLER, 2014).

O uso de antibióticos após o parto, em alguns casos se faz necessário. Além da redução na taxa de micróbios, seus efeitos sobre a estrutura da colonização intestinal podem persistir além do período do tratamento (CANANI; GILBERT; NAGLER, 2015).

A relação entre a microbiota intestinal e o sistema imune nos primeiros meses de vida parece ser de grande importância, uma vez que é um período conhecido como "janela

imunológica”, durante o qual a microbiota intestinal infantil pode influenciar eventos imunológicos essenciais que alteram a sensibilização alérgica. Nessa fase, a maturação do sistema imune não está completa e ainda está sendo desenvolvida a tolerância imunológica contra alérgenos alimentares e antígenos microbianos. Dessa forma, as bactérias comensais intestinais e o seu estabelecimento sequencial desempenham um papel crucial no desenvolvimento do tecido linfóide associado ao intestino ou GALT (do inglês: *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) e na modulação do equilíbrio entre células Th1/Th2/Treg, constituindo um importante fator no desenvolvimento de tolerância oral (TSABOURI et al., 2014). A microbiota intestinal interage com componentes da imunidade inata e adaptativa no sistema imune mucoso e através desses mecanismos conduz a diferenciação de células Treg. A colonização do hospedeiro pela microbiota comensal e a presença de múltiplos componentes da dieta são a chave para a função celular imunitária mucosa adequada. As espécies bacterianas individuais promovem a diferenciação de populações de células T intestinais distintas (HARRISON; POWRIE, 2013; MCLOUGHLIN; MILLS, 2011).

Outro fator ambiental que vem sendo destacado na gênese das alergias alimentares é a vitamina D. De acordo com Vassalo e Camargo Jr. (2010), a deficiência de vitamina D em um período crítico como nos primeiros meses de vida, pode aumentar a suscetibilidade para colonização de flora microbiana anormal e infecções gastrointestinais, contribuindo para uma perda da integridade da barreira intestinal e exposição excessiva do sistema imune aos alérgenos alimentares, levando a quebra da tolerância oral e desenvolvimento de alergias alimentares. Ly et al. (2011) também destacam que a vitamina D pode ser uma via importante para conduzir a homeostase por modificar a relação entre a microbiota intestinal e o sistema imune do hospedeiro.

### **2.3 APLV: Fenótipos clínicos e mecanismos imunológicos**

A complexidade da APLV está relacionada ao espectro de patogênese que varia de acordo com o mecanismo imunológico envolvido (GIBBONS et al., 2012). Na resposta aos antígenos alimentares como as proteínas do leite de vaca, observa-se a interação entre a imunidade inata e adaptativa, podendo desencadear respostas de diferentes intensidades (JO et al., 2014).

As células do sistema imune inato desempenham um papel crucial na iniciação e na direção posterior da resposta imune adaptativa como as células apresentadoras de antígenos que vão induzir os linfócitos T a se diferenciarem (JANEWAY et al., 2001). Mastócitos, basófilos e eosinófilos são consideradas como as principais células efetoras sobre a exposição à alérgenos. Nas reações mediadas por IgE, os mastócitos, basófilos e eosinófilos representam um papel crucial devido à sua expressão na superfície de receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI) e sua capacidade para secretar mediadores de inflamação alérgica após a ligação cruzada com alérgenos específicos. Por isso, estas células contribuem para as reações de início imediato e nas reações de início tardio (horas após a exposição) (JO et al., 2014). Os mediadores liberados após a degranulação dos mastócitos, particularmente a histamina, pode estimular células endoteliais ou epiteliais a liberar um potente quimioatratador de eosinófilos, denominado de eotaxina (MENZIES-GOW et al., 2004). Outros mediadores recém-sintetizados, tais como leucotrienos (LTC), por exemplo, LTC<sub>4</sub>; prostaglandinas (PGD), por exemplo, PGD<sub>2</sub> e citocinas, por exemplo, IL-3, IL-5, conduzem ao recrutamento de células inflamatórias responsáveis pela resposta de fase tardia mediada por IgE (SUAINI et al., 2015). A IL-5 liberada atrai os eosinófilos, prolongam a sua sobrevivência, aumentam a adesão às células endoteliais e sua função efetora. O tecido infiltrado de eosinófilos, posteriormente, libera proteínas tóxicas que contribuem para o prolongamento da resposta inflamatória e pode resultar em gastroenteropatias eosinofílicas (JO et al., 2014).

Em adição, o sistema imune adaptativo, através da atuação dos linfócitos Th determina a resposta contra o alérgeno alimentar. Tendo como característica a plasticidade, podendo se diferenciar para um perfil Th1, Th2 ou Treg. As células Th1 foram caracterizadas pela sua capacidade de produzir IFN- $\gamma$ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-2. São eficientes na estimulação de macrófagos e ativação de células T citotóxicas (Tc), induzindo, dessa forma, o que é chamado de imunidade mediada por células, tendo como característica um início de resposta mais lento. Em contraste, as células Th2 são produtoras de IL-4, IL-5 e IL-13, eficazes em estimular as células B a produzirem IgE e contribuem para a patogênese das reações imediatas (JO et al., 2014; BONILLA; OETTGEN, 2010; CLARK; KUPPER, 2005). Por outro lado, os linfócitos responsáveis pelo controle de uma variedade de respostas imune são as células Treg. As citocinas por elas produzidas são IL-10 e TGF- $\beta$ , consideradas cruciais para a manutenção da homeostase imune (SAKAGUCHI et al., 2009). Dessa forma, a supressão da diferenciação de células Treg conduz para a polarização de células Th para um perfil inflamatório, geralmente Th2 (MELO; CARVALHO, 2009).

A caracterização do tipo de resposta imunológica envolvida na APLV, através do estudo da história clínica de sintomas, associada a dosagens dos marcadores biológicos disponíveis, auxiliam na condução do tratamento e na estimativa do prognóstico para o paciente (SHEK et al., 2005). Na APLV, a resposta imunológica pode ser mediada por IgE, não mediada por IgE ou mista e apresenta um espectro de fenótipos que inclui sintomas clínicos leves, moderados e graves, podendo causar risco a vida da criança (DU TOIT et al., 2010).

A APLV mediada por IgE tem sido mais estudada do que as reações não mediadas por IgE, sendo classificada como reação de hipersensibilidade do tipo I ou hipersensibilidade imediata. O início dos sintomas é rápido, ocorrendo em minutos a até duas horas após a exposição às proteínas do leite de vaca (CRITTENDEN; BENNETT, 2005). É caracterizada por dois estágios: o primeiro é chamado de fase de sensibilização, na qual os alérgenos são ingeridos, internalizados e expressados na superfície das células apresentadoras de antígenos. Estas por sua vez, interagem com os linfócitos Th virgens, polarizando-os para um perfil Th2, com produção de citocinas como a IL-4 e promovem a ativação de linfócitos B. Esses mais tarde produzem anticorpos IgE contra as proteínas do leite. A segunda fase é iniciada após uma exposição subsequente às proteínas do leite, chamada de fase de ativação. Nesta fase, a IgE ligada a receptores de alta afinidade na superfície de mastócitos e basófilos se ligam a epítomos alérgicos de proteínas do leite. Essa interação promove uma cascata de eventos intracelulares que desencadeia a liberação de histamina, fator ativador de plaquetas (PAF) e outros mediadores inflamatórios que promovem os sintomas alérgicos como edema, eritema e prurido (HUANG; KIM, 2012; ALLEN; MARTIN, 2010; BENHAMOU et al., 2009).

É importante destacar que muitas crianças podem apresentar sensibilização para as proteínas do leite de vaca, com presença de anticorpos IgE específicos no sangue, porém não são consideradas alérgicas. Segundo Martorell-Aragonés et al. (2015), apenas a produção de IgE específica, que pode ser evidenciada em testes cutâneos de hipersensibilidade ou pela dosagem sérica, não caracteriza alergia. Porém, o indivíduo é considerado alérgico quando, além da presença de IgE específica para o alérgeno, reproduz sintomas quando exposto ao alérgeno.

Na APLV mediada por IgE, os sintomas mais comumente apresentados são os cutâneos, como prurido na boca e lábios, eczema, urticária e angioedema, associados a sintomas gastrintestinais como vômitos imediatos, dor abdominal, náusea e diarreia. No entanto, pode ser acometido o trato respiratório, com rinoconjuntivite, sibilância e asma ou até mesmo acometer mais de um órgão ou sistema, a exemplo do comprometimento do sistema

cardiovascular e respiratório evidenciado na anafilaxia grave (MARTORREL et al., 2015; CALDEIRA; CUNHA; FERREIRA, 2011; KATTAN; COCCO; JÄRVINEN, 2011).

A anafilaxia é definida como uma reação sistêmica ou generalizada de hipersensibilidade grave, de início rápido e potencialmente fatal, devido aos problemas circulatórios ou respiratórios causados, e é geralmente associada a alterações na pele e/ou mucosas (MURARO et al., 2014). Em pacientes com APLV, a anafilaxia se caracteriza como o quadro clínico mais grave de sintomas, podendo estar presente em até 9% dos casos (HUANG; KIM, 2012). Crianças com APLV que não toleram preparações contendo leite extensivamente aquecido, como as preparações assadas (biscoitos e bolos), apresentam um maior risco para reações mais graves (MEHR et al., 2014).

Pacientes com APLV mediada por IgE apresentam um maior risco de desenvolverem alergias alimentares múltiplas e condições atópicas como a asma alérgica em fase futura da vida, fenômeno conhecido como “marcha atópica”, principalmente quando a alergia alimentar é persistente (HOST et al., 2002). Sampaio et al. (2005), avaliando 76 crianças com APLV mediada por IgE, mostraram que aquelas com quadro clínico de sintomas persistente (>36 meses de tempo de doença) apresentaram maior prevalência de asma, em comparação às crianças com quadro clínico transitório (<24 meses de tempo de doença).

Estima-se que a maioria dos quadros clínicos de APLV com sintomas predominantemente gastrintestinais seja não mediado por IgE (NOWAK-WEGRZYN, 2015). O mecanismo imunológico da APLV não mediada por IgE não é tão bem descrito como nas reações mediadas por IgE. Sinais e sintomas digestivos podem ser decorrentes da inflamação, dismotilidade ou a combinação de ambos (KOLETZKO et al., 2012). Seu diagnóstico é desafiador, devido à ausência de marcadores biológicos disponíveis (GIBBONS et al., 2012; DU TOIT et al., 2010). Segundo Vandenplas; Marchand; Meyns (2015), é difícil separar as “alergias não mediadas por IgE” das “desordens funcionais gastrintestinais” em lactentes com reações adversas à fórmulas infantis.

Nesse tipo de fenótipo da APLV são implicados mecanismos imunológicos que incluem reações envolvendo linfócitos Th1, com ativação de células inflamatórias via produção de IFN- $\gamma$  (hipersensibilidade do tipo IV), formação de imunocomplexos com IgA e IgG (hipersensibilidade do tipo III) levando a ativação do sistema complemento ou a resposta de linfócitos T (VITALITI et al., 2012; CRITTENDEN; BENNETT, 2005).

Em crianças com APLV mediada por células, as manifestações clínicas tendem a ser tardias, com o início dos sintomas ocorrendo após duas horas a até mesmo dias após a exposição às proteínas do leite de vaca. Os sintomas se sobrepõem, podendo ser diversos e de intensidade variável (LIFSCHITZ; SZAJEWSKA, 2015). Pode-se destacar como manifestações gastrointestinais de APLV de início tardio o refluxo gastroesofágico (RGE), diarreia (com ou sem má absorção proteica), sangue e/ou muco nas fezes, dor abdominal, cólicas graves, aversão/recusa alimentar (saciedade precoce por esvaziamento gástrico retardado), constipação intestinal, eritema perianal e fissuras anais. Outros problemas que podem estar associados aos distúrbios gastrointestinais, podendo trazer consequências importantes são a anemia ferropriva e má evolução pôndero-estatural (FERREIRA et al., 2014; KOLETZKO et al., 2012).

A enterocolite induzida por proteína alimentar ou FPIES (do inglês: *food protein-induced enterocolitis syndrome*) é uma manifestação rara, porém potencialmente grave. O leite de vaca é considerado o mais comum causador dessa síndrome em crianças (YANG et al., 2016). Caracteriza-se por vômitos recorrentes (início entre 1-3 horas após a ingestão), letargia, palidez, diarreia (início entre 5-10 horas após a ingestão), desidratação com progressão para choque hipovolêmico em 15-20% dos casos, hipoalbuminemia e deficiência de crescimento (em um quadro crônico). Podendo ser desencadeada nos primeiros meses de vida ou até um ano de idade. O início tardio dos sintomas pode ser atribuído a atraso na introdução de leite de vaca em crianças amamentadas (NOWAK-WĘGRZYN, 2015). Embora rara, a FPIES pode se manifestar durante o aleitamento materno exclusivo (MICELE SOPO et al., 2014). O atraso no diagnóstico é comum, levando a desnutrição e repercussões negativas sobre o crescimento (YANG et al., 2016). Várias alterações imunológicas têm sido descritas em pacientes com FPIES. As células T podem desempenhar um papel central na fisiopatogenia dessa síndrome. Um déficit na resposta do TGF- $\beta$ 1 e aumento do TNF- $\alpha$  intestinal foram encontradas na FPIES. A resposta imunológica humoral também pode estar envolvida, com aumento dos níveis de IgA específica e uma diminuição da IgG4 específica. A secreção de citocinas e quimiocinas diferentes durante a reação inflamatória pode justificar a leucocitose com desvio a esquerda (BERIN, 2015).

A enteropatia induzida por proteínas do leite de vaca se caracteriza por diarreia prolongada com sangue e vômitos ocasionais, podendo acarretar em má absorção de nutrientes, com hipoproteinemia, anemia e retardo do crescimento; em alguns casos pode causar acidose metabólica (FERREIRA et al., 2014; MEYER; SCHWARZ; SHAH, 2012). O mecanismo

imune envolvido não é claro, sabe-se, no entanto, que há envolvimento de células T (NOWAK-WĘGRZYN et al., 2015). No diagnóstico, observa-se a melhora clínica após a dieta de exclusão de leite de vaca seguida de teste confirmatório. Também pode ser realizado exame endoscópico com biópsia do intestino, sendo observada, além da inflamação da mucosa, uma desorganização da arquitetura das vilosidades intestinais, que podem ser confundidas com doença celíaca não tratada (DU TOIT et al., 2010).

A proctocolite alérgica induzida por proteína alimentar é reconhecida como uma doença da infância. O início dos sintomas se dá nas primeiras semanas a meses de vida, com cólicas e presença de sangue e muco nas fezes, no entanto, é considerada como um quadro benigno, pois não é observada alteração no padrão das dejeções ou pode ocorrer diarreia ocasional e as crianças apresentam boa evolução ponderal (FERREIRA et al., 2014). O mecanismo fisiopatológico ainda não foi totalmente identificado. Porém, sabe-se que envolve a presença de linfócitos T CD8, bem como linfócitos do tipo Th2 e infiltrado eosinofílico em todas as camadas da mucosa colônica. Também foi observada presença de linfócitos T circundantes, associada à secreção de TNF- $\alpha$  pelos linfócitos ativados (FAGUNDES-NETO; GANC, 2013).

Essencialmente, todas as manifestações gastrointestinais de alergias alimentares não mediadas por IgE apresentam alterações na motilidade, sendo denominada de dismotilidade alérgica, incluindo vômitos, RGE, cólicas, diarreia e constipação intestinal (MEYER; SCHWARZ; SHAH, 2012). Os mecanismos imunológicos responsáveis por esses distúrbios não estão claramente elucidados, no entanto, estudos preliminares apontam a interação de células inflamatórias como mastócitos e eosinófilos com o sistema nervoso entérico, chamada de interação neuroimune, podendo explicar as mudanças no peristaltismo do trato gastrointestinal durante a resposta inflamatória alérgica (MEYER; SCHWARZ; SHAH, 2012; DU TOIT et al., 2010).

A APLV deve ser considerada como uma possível causa de constipação intestinal em lactentes que desenvolvem fezes duras e pouco frequentes, durante o período de introdução de fórmula infantil (MEYER; SCHWARZ; SHAH, 2012). O mecanismo patogênico proposto para explicar a relação entre APLV e constipação intestinal seria o aumento da pressão do esfíncter anal interno em repouso decorrente da resposta inflamatória alérgica com infiltração de mastócitos e eosinófilos, de modo que a criança precisaria fazer um esforço excessivo ao evacuar (DU TOIT et al., 2010).

## 2.4 História natural da APLV

O prognóstico da APLV é favorável, uma vez que, na maioria dos casos, se comporta como uma condição transitória. A tolerância às proteínas do leite deve-se a maturação do trato gastrointestinal e do sistema imunológico. Na maioria dos pacientes, a tolerância é adquirida ainda na infância ou até o início da adolescência. Contudo, uma minoria persiste até a fase adulta, predominantemente os casos de reações mediadas por IgE (SAVAGE; JOHNS, 2015).

Pesquisas têm sido realizadas em muitos países, com enfoque na evolução da APLV, relatando diferentes taxas de resolução. Estudos mais antigos como o publicado por Host e Halken (1990), avaliando 39 crianças da Dinamarca com reações mediadas e não mediadas por IgE, encontraram uma taxa de tolerância de 56% em um ano, 77% em dois anos, 87% em três anos, 92% em cinco anos e 97% aos 15 anos de idade. Em outro estudo do mesmo ano, com 100 crianças da Austrália, a tolerância às proteínas do leite de vaca foi alcançada em 28% dos pacientes aos dois anos de idade, 56% aos quatro anos e 78% aos seis anos (BISHOP; HILL; HOSKING, 1990).

Menores taxas de resolução na infância também foram observadas em estudo retrospectivo com 807 pacientes com APLV mediada por IgE nos Estados Unidos da América (EUA). A tolerância oral foi identificada em 19% aos quatro anos, 42% aos oito anos, 64% aos 12 anos e 79% aos 16 anos de idade (SKRIPAK et al., 2007). Da mesma forma, Dias; Santos e Pinheiro (2010), realizaram um estudo retrospectivo com 79 crianças com APLV em Portugal. Destas, 93% tinham reações imediatas. A tolerância ao leite de vaca foi identificada em 17,7% aos quatro anos, 31,6% aos seis anos e 39,2% aos oito anos. Aos 10 anos de idade, 40% das crianças permaneciam com sintomas de APLV.

Em estudo realizado com 148 crianças com APLV IgE mediada na Turquia, seguidas por até 3,5 anos, 44,6% desenvolveram tolerância ao leite de vaca ao fim do estudo (YAVUZ et al., 2013). Em contraste, 82% das 170 crianças espanholas com APLV mediada por IgE, acompanhadas por 48 meses apresentaram tolerância ao leite de vaca no fim do estudo (MARTORREL-ARAGONÉS et al., 2008). Achados similares foram encontrados em um estudo polonês, com 291 pacientes com APLV mediada por IgE, com idades entre dois a 14 anos. A tolerância ao leite de vaca foi diagnosticada em 212 (72,9%) pacientes, com idade média de 5,2 anos (KACZMARSKI et al., 2013).



No estudo realizado por Elizur et al. (2012), com 54 crianças com APLV mediada por IgE, 57,4% desenvolveram tolerância ao leite de vaca entre quatro a cinco anos de idade. No entanto, a maioria (70,9%) desenvolveu tolerância nos primeiros dois anos. Dados similares foram encontrados em estudo com 293 pacientes a partir de uma coorte dos EUA. A resolução da APLV foi identificada em 154 (52,6%) crianças com idade média de cinco anos. Destes, 56 apresentaram teste de tolerância ao leite de vaca negativo e 98 não apresentaram sintomatologia após a introdução doméstica de leite e derivados na dieta (WOOD et al., 2013).

Na Alemanha, um estudo retrospectivo com 52 crianças com reações mediadas por IgE (90% apresentando dermatite atópica) encontrou-se uma taxa de resolução da APLV de 61,5% (AHRENS et al., 2012).

Segundo Spergel (2013), a heterogeneidade da história natural da APLV está fortemente relacionada com o fenótipo clínico de sintomas apresentados pela criança. Muitos estudos mostram uma tendência para o desenvolvimento de tolerância mais cedo em crianças com APLV mediada por células, em comparação àquelas com sintomatologia mediada por IgE (SKRIPAK et al., 2007; SAARINEN et al., 2005; VANTO et al., 2004; HOST; HALKEN, 1990).

Ao se avaliar a história natural de acordo com síndromes clínicas relacionadas com APLV, observa-se que a proctocolite alérgica apresenta elevada taxa de resolução entre um a três anos, no entanto, a maioria alcança tolerância já no primeiro ano de vida (NOWAK-WĘGRZYN, 2015). Estudos relatando a evolução de pacientes com FPIES relacionada à APLV, mostraram que a tolerância pode ser alcançada entre um ano de idade (YANG et al., 2015) a dois anos de idade (MICELI SOPO et al., 2012).

Em algumas dessas pesquisas, foram avaliadas variáveis que poderiam ajudar a prever o prognóstico de tolerância ao leite de vaca. Dentre eles, os níveis de IgE específica para o leite de vaca, tanto no momento do diagnóstico como durante a condução do tratamento, sensibilização a outros alérgenos alimentares, o tamanho da pápula após o teste cutâneo de hipersensibilidade, a existência de outras condições alérgicas como asma, dermatite atópica e rinite alérgica foram considerados como bons indicadores para o desfecho clínico da APLV (YAVUZ et al., 2013; AHRENS et al., 2012; WOOD et al., 2013; SKRIPAK et al., 2007; SAARINEN et al., 2005; VANTO et al., 2004). Wood et al. (2013) criaram uma calculadora online para prever a história natural da APLV, disponível no endereço eletrônico [www.cofargroup.org](http://www.cofargroup.org), a partir dos resultados encontrados no estudo.

A ampla variabilidade observada nas taxas de resolução relatadas nos estudos publicados pode ser explicada por diferenças nas características das populações estudadas (herança genética, história clínica e gravidade dos sintomas), bem como no desenho dos estudos, tendo em vista que alguns foram realizados a partir de uma coorte de nascimento, enquanto outros foram realizados com crianças atendidas em centros de saúde, que possivelmente podem ter quadros clínicos mais graves. Além disso, os métodos seguidos para identificar o prognóstico clínico indicam que ainda não é possível realizar uma estimativa global da história natural da APLV (NICOLAOU; TSABOURI; PRIFTIS, 2014).

## **2.5 APLV: Quebra da tolerância oral**

A tolerância oral é um processo ativo, no qual o sistema imune não responde a antígenos administrados oralmente, como as proteínas dos alimentos (COMMINS, 2015; PABTS; MOWAR, 2012). O estado de tolerância induzida por antígenos alimentares contrasta com a resposta imune ativa, necessária para proteger o intestino contra o bombardeio contínuo por patógenos ou seus produtos (STROBEL; MOWAT, 2006). A falha em induzir tolerância desencadeia uma série de doenças, dentre elas as alergias alimentes (VICKERY et al, 2011).

Para manter a tolerância, o sistema imunológico deve não apenas ser hábil em distinguir os antígenos próprios dos não próprios, mas também deve ser capaz de discriminar os antígenos não próprios inócuos daqueles que podem trazer riscos (CHINTHRAJAH et al., 2016). A grandiosidade desta tarefa é indiscutivelmente mais crucial nas superfícies epitelial e mucosas, tais como a pele, trato respiratório e trato gastrointestinal, nas quais o organismo encontra um grande número de proteínas, tanto inócuas como potencialmente patogênicas (PELZ; BRYCE, 2015). A exposição a antígenos no intestino leva a proteção local e resposta imune sistêmica (BURKS; LAUDACH; JONES, 2008).

A integridade do trato gastrintestinal é apontada como fator primordial na indução da tolerância oral. Este, é considerado como o maior órgão imunológico do corpo, compreende cerca de 300 metros quadrados de área de superfície, o qual é exposto de forma contínua a uma vasta quantidade de antígenos exógenos, incluindo as bactérias comensais e proteínas da dieta (CHEHADE; MAYER, 2005). O trato gastrintestinal recebe cerca de 70g a 100g de proteínas provenientes da dieta a cada dia. O sistema imune mucoso desenvolveu mecanismos sofisticados, através dos quais ele pode determinar quando uma resposta imune é necessária,

bem como as formas de manter o controle sobre respostas aberrantes, e o equilíbrio entre esses mecanismos é fundamental para a saúde (PELZ; BRYCE, 2015). Um funcionamento adequado do sistema imunológico intestinal elimina agentes patogênicos, tolera antígenos ambientais inofensivos, tais como as proteínas dos alimentos, e mantém a flora bacteriana comensal. Estas tarefas são perfeitamente conseguidas com inflamação mínima do tecido (SAVILAHTI; SAVILAHTI, 2013).

A barreira intestinal é composta por uma única camada de epitélio colunar que separa o lúmen do resto do corpo, sob a qual é produzida uma camada viscosa de muco para revestimento e proteção. As junções entre as células epiteliais sustenta a integridade da barreira e reduz a permeabilidade paracelular (YU; YANG, 2009). As células M presentes no epitélio intestinal atuam como via de acesso ao sistema imune por transferir antígenos por pinocitose à lâmina própria (NEUTRA, 1998).

No intestino também está presente uma estrutura linfóide especializada (GALT), incluindo as placas de Peyer no duodeno e folículos linfóides que são incorporados na lâmina própria de todo o trato intestinal (MOWAT, 2003). Três tipos de células especializadas existentes no trato gastrointestinal e são capazes de processar proteínas dietéticas que sobrevivem ao processo digestivo, e estas incluem as células M, células das microvilosidades e as células dendríticas. As células M são capazes de translocar antígenos do lúmen intestinal para as células apresentadoras de antígenos por mecanismo transcelular (PELZ; BRYCE, 2015).

As células epiteliais participam ativamente na resposta imune a antígenos alimentares. Elas são uma fonte rica de quimiocinas que recrutam células efectoras na mucosa gastrointestinal (STEELE; MAYER; BERIN, 2012).

As células dendríticas são reconhecidas como potentes indutoras de tolerância oral e não responsividade a antígenos corporais e estranhos (RESCIGNO, 2011). Estas células estão localizadas entre as células M e as placas de Peyer. Dessa forma, quando células M transferem antígenos para as células dendríticas, esta última produz citocinas favoráveis para o desenvolvimento de células Treg e subsequente tolerância (CHAHINE; BAHNA, 2010).

Em condições fisiológicas normais, as células dendríticas são quiescentes ou imaturas, mas são suficientemente responsivas a estímulos inflamatórios, quando necessário, embora com capacidade limitada. Contudo, a maturação dessas células é necessária para adequada estimulação das células Th virgens no desenvolvimento de tolerância ou início da resposta

imune (TAN; O'NEILL, 2005). Existem vários tipos diferentes de células dendríticas na mucosa do trato gastrointestinal. Porém, uma classe específica, que expressa as integrinas CD103<sup>+</sup> mostraram ser preferencialmente mais envolvidas na apresentação de antígeno a células T e induzir a sua maturação em células Treg para uma resposta imune tolerogênica (BERIN; SHREFFLER, 2015; PELZ; BRYCE, 2015).

Na superfície da mucosa, a imunoglobulina A secretória (IgAs) é a primeira linha de defesa contra antígenos por inibir a adesão de microorganismos e prevenir a absorção de proteínas intactas (WIJK; KNIPPELS, 2007). Em estudo realizado por Järvinen (2000), observou-se que os níveis de anticorpos IgA total e específico para o leite de vaca no colostro e leite materno maduro foram menores no leite das mães cujos bebês desenvolveram APLV. Os autores afirmam que os baixos níveis de IgAs podem levar a defeitos na exclusão de antígenos alimentares e, assim, predispor ao desenvolvimento da alergia alimentar.

O processo de digestão dos alimentos também desempenha um papel na geração da tolerância. O ácido gástrico e as enzimas digestivas ajudam a quebrar as proteínas dietéticas, transformando-as em pequenos peptídeos e aminoácidos para a sua absorção pelos enterócitos. Este processo também reduz alguns dos epítomos lineares e conformacionais das proteínas em cadeias menos imunogênicas (PELZ; BRYCE, 2015). No entanto, uma pequena porcentagem de proteínas intactas escapa da digestão e são absorvidas através da barreira mucosa. Nesta forma são imunologicamente ativas, ou seja, podem ser apresentadas por células apresentadoras de antígenos e desencadear resposta imune alérgica (BERIN; SHREFFLER, 2015).

Ainda não está claro se existe um período crítico para a exposição a antígenos ou um tipo ideal de exposição do antígeno para o desenvolvimento de tolerância. Muitos acreditam que o primeiro contato com antígeno na mucosa gastrointestinal ou para o GALT pode promover respostas tolerogênicas a proteínas alimentares (CHINTHRAJAH et al., 2016).

Na captação e apresentação de antígenos alimentares, tem sido observado que as placas de Peyer podem apresentar alguns antígenos de forma seletiva. No entanto, ao se estudar o papel de diferentes estruturas linfóides organizadas no desenvolvimento de tolerância oral, sugere-se que as placas de Peyer são dispensáveis para a indução de tolerância oral, ao passo que os linfonodos mesentéricos são necessários (BERIN; SHREFFLER, 2015). Uma vez que os macrófagos presentes na mucosa do intestino, incluindo a lamina própria, devem captar antígenos do lúmen intestinal e levá-los a linfonodos para apresentação às células T (SHAKHAR; KOLESNIKOV, 2014).

Vários mecanismos envolvendo as células T no desenvolvimento de tolerância oral têm sido descritos, incluindo a exclusão clonal, anergia (estado de não responsividade) e supressão ativa de células T (FARIA; WEINER, 2005). Acredita-se que a dose administrada influencia nos mecanismos responsáveis pela tolerância, na qual elevadas doses do antígeno causam anergia ou deleção de linfócitos T, enquanto múltiplas doses baixas do antígeno resultam em ativação de células Treg (CHEHADE; MAYER, 2005).

Existem vários fatores que podem estar envolvidos na quebra do processo de tolerância oral nos lactentes. No início da vida a barreira intestinal ainda não está totalmente desenvolvida. A secreção de enzimas proteolíticas e secreção ácida do estômago podem ser subótimas, o que pode resultar em maior exposição a antígenos alergênicos como as proteínas do leite de vaca. Deficiência de IgAs pode estar implicada no desenvolvimento de alergias alimentares pela incapacidade de combater adequadamente patógenos. A flora microbiana intestinal pode influenciar tanto o desenvolvimento de tolerância como a resposta imune alérgica. Em adição, o sistema imunológico durante a gravidez e na infância é desviado para um perfil Th2. Nessa fase crítica, os fatores genéticos como a ocorrência de polimorfismos em genes relacionados com o sistema imune e fatores ambientais podem impedir que se alcance o equilíbrio entre a produção de células Th1/Th2, podendo levar ao desenvolvimento de APLV (SAVILAHTI; SAVILAHTI, 2013).

### **2.5.1 O papel das células Treg na tolerância oral**

As células Treg desempenham um papel crucial no controle das respostas imunológicas, conduzindo para um perfil tolerogênico (MOSER; SALZER; KRAUSE, 2011). São definidas como uma população heterogênea de células T com propriedades supressivas e imunes que são essenciais para a manutenção da tolerância a substâncias inofensivas e prevenção de respostas imunes excessivas ou mal orientadas contra patógenos (PALOMARES, 2013).

Embora seja conhecido que existem múltiplos subtipos de células Treg e que estas populações podem exibir plasticidade fenotípica, os papéis dos subtipos de células Treg individuais na tolerância oral ainda não estão bem definidos. Ambas células Treg, que expressam (+) ou não (-) o fator de transcrição Foxp3 podem ser encontradas no intestino e,

muitas células Treg Foxp3<sup>-</sup> são susceptíveis a induzir periféricamente células regulatórias tipo I, que produzem grandes quantidades de IL-10 e TGF- $\beta$  (CHINTHRAJAH et al., 2016).

O Foxp3 é um fator de transcrição vital para a indução e manutenção de um fenótipo de células Treg (HARRISON; POWRIE, 2013). O timo é a origem de uma população de células Treg que expressam FoxP3 e são denominadas células Treg naturais (nTreg). Estas são distintas de outra população de células Treg CD4<sup>+</sup>, que são induzidas na periferia e também expressam FoxP3, denominada de células Treg induzidas (iTreg). Em experimentos, as células nTreg foram consideradas dispensáveis para a indução de tolerância oral. Em contraste, células iTreg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) são necessários para a indução de tolerância oral (BERIN; MAYER, 2013). Células iTreg que secretam IL-10 são muitas vezes referidas como células IL-10-Treg ou células Tr1, no entanto, aqueles que segregam TGF- $\beta$  têm sido referidas como células Th3 (HAWRYLOWICZ, 2005).

A observação de casos da Síndrome de imunodesregulação, poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X ou IPEX (do inglês: *Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked*), uma doença rara em que o fator de transcrição FoxP3 é deficiente devido a uma mutação no gene que codifica esse fator de transcrição, mostra que existe uma elevada incidência de alergias alimentares nesses pacientes, com elevados níveis de IgE, eosinofilia e eczema grave. Além disso, modelos animais também evidenciam o papel das células Treg FoxP3<sup>+</sup> na tolerância oral (CHINTHRAJAH et al., 2016).

Uma classe importante de células Treg é a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que expressam altos níveis do fator de transcrição FoxP3, que é essencial para o seu desenvolvimento e função (HAWRYLOWICZ, 2005). São originárias do timo e migram para órgãos linfoides, principalmente para o baço, sugerindo papel importante na proliferação e diferenciação de células Th virgens. Apresentam a característica de reconhecimento do que é próprio do organismo e, portanto, têm sido associadas com a manutenção da auto-tolerância periférica (COMMINS, 2015). Em estudo realizado com crianças com APLV que adquiriram tolerância, observou-se o desenvolvimento de uma população de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> circulantes, em comparação com crianças que permaneciam clinicamente alérgicas. Sugerindo que a indução de tolerância clínica a antígenos dietéticos está associada com o desenvolvimento de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (KARLSSON; RUGRVEIT; BRANDTZAEG, 2004).

A IL-2 parece ter papel importante no desenvolvimento das células Treg. Experimentos com animais demonstraram que a deficiência tanto da citocina quanto do

receptor, resultou em defeitos graves em células Treg. O que também foi observado em pacientes com deficiência congênita da molécula CD25 (MELO; CARVALHO, 2009).

Os mecanismos utilizados pelas células Tregs para exercer a função supressora ainda não foram esclarecidos. Porém, foram identificados mecanismos diferentes, incluindo a secreção da citocina anti-inflamatória IL-10, de TGF- $\beta$  e, mais recentemente, em estudos realizados em ratinhos, de IL-35. Mecanismos adicionais podem incluir citólise direta de células alvo (DIMELOE et al., 2010).

### 2.5.2 O papel das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- $\beta$

IL-10 e TGF- $\beta$  são citocinas anti-inflamatórias que modulam a imunidade celular e inflamação alérgica. É sabido que essas citocinas desviam a produção de anticorpos, de IgE para isotipos IgA e IgG4, respectivamente, conhecidamente anti-inflamatórios. Além de suprimir células Th1 e Th2 específicas para alérgenos (CAMPOS ALBERTO et al., 2008).

A IL-10 foi inicialmente reconhecida pela sua capacidade de inibir a ativação e função efetora de células T, monócitos e macrófagos. É uma citocina pleiotrópica multifuncional com efeitos diversos na maioria das células hematopoiéticas. Sua atividade está relacionada com a regulação do início e término da resposta inflamatória, além de regular o crescimento e diferenciação de células B, células *Natural Killer* (NK) citotóxicas, células Treg, mastócitos, granulócitos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais (MOORE et al, 2001). Além de ser associada a anergia de células T CD4<sup>+</sup> (GROUX et al., 1996). Essa citocina pode ser produzida por monócitos e macrófagos, linfócitos T e B, células dendríticas, outros leucócitos (mastócitos, neutrófilos e eosinófilos) e algumas células epiteliais, incluindo queratinócitos. Em células T, a expressão de IL-10 define um subconjunto de células Treg que pode se desenvolver a partir de células precursoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> (CHO; ELLEBRECHT; PAYNE, 2015).

A IL-10 foi a princípio denominada como citocina fator inibidor da síntese, baseada em sua atividade biológica, porque inibe a produção de citocinas por linfócitos Th1 e Th2, fagócitos mononucleares e células NK. Esse efeito é mediado através da inibição da função de células apresentadoras de antígenos porque ela bloqueia a maturação das células dendríticas e

regula negativamente a expressão do MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86. Consequentemente, diminui a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  e Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Além disso, previne a apoptose de células B (READLER et al., 2012; MOSSER; ZHANG, 2008).

O TGF- $\beta$  consiste em uma família de citocinas pleiotrópicas que também regulam as múltiplas funções celulares como a proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência. A família de citocinas TGF- $\beta$  é codificada por genes individuais e consiste em três isoformas: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3. Destas, destaca-se o papel dominante para TGF- $\beta$ 1 na indução de tolerância imunológica (HARRISON; POWRIE, 2013). As células Treg são reguladas pela sinalização do TGF- $\beta$ , fato evidenciado em estudos com ratos deficientes em TGF- $\beta$ 1 (WAN; FLAVELL, 2007).

O TGF- $\beta$  demonstra atividade autócrina, estimulando as células, através da qual ela foi produzido para intensificar essa produção. Suprime a proliferação de linfócitos B e a produção de IgG e IgM. Por outro lado, esta citocina estimula linfócitos B para produzirem IgA. Em adição, TGF- $\beta$  interfere na produção de IL-12 por macrófagos, limitando assim o tipo de resposta imune celular (Th1). Auxiliado por células NK, o TGF- $\beta$  aumenta o efeito imunossupressor das células CD8 efectoras. Os linfócitos Th3 produzem TGF- $\beta$  e contribuem para supressão ativa e desenvolvimento de tolerância a antígenos alimentares (MAREK et al., 2002).

Uma redução na produção de TGF- $\beta$ 1 devido à estimulação inadequada da imunidade inata por microflora intestinal pode contribuir para o quebra de tolerância oral. Em estudo realizado com crianças com múltiplas alergias alimentares e controles, foi observada redução de linfócitos TGF- $\beta$ 1<sup>+</sup> na lâmina própria e no epitélio intestinal e a redução da expressão de TGF- $\beta$ 1 também foi observada em células mononucleares das crianças com alergia alimentar (PÉREZ-MACHADO et al., 2003).

## **2.6 Considerações finais**

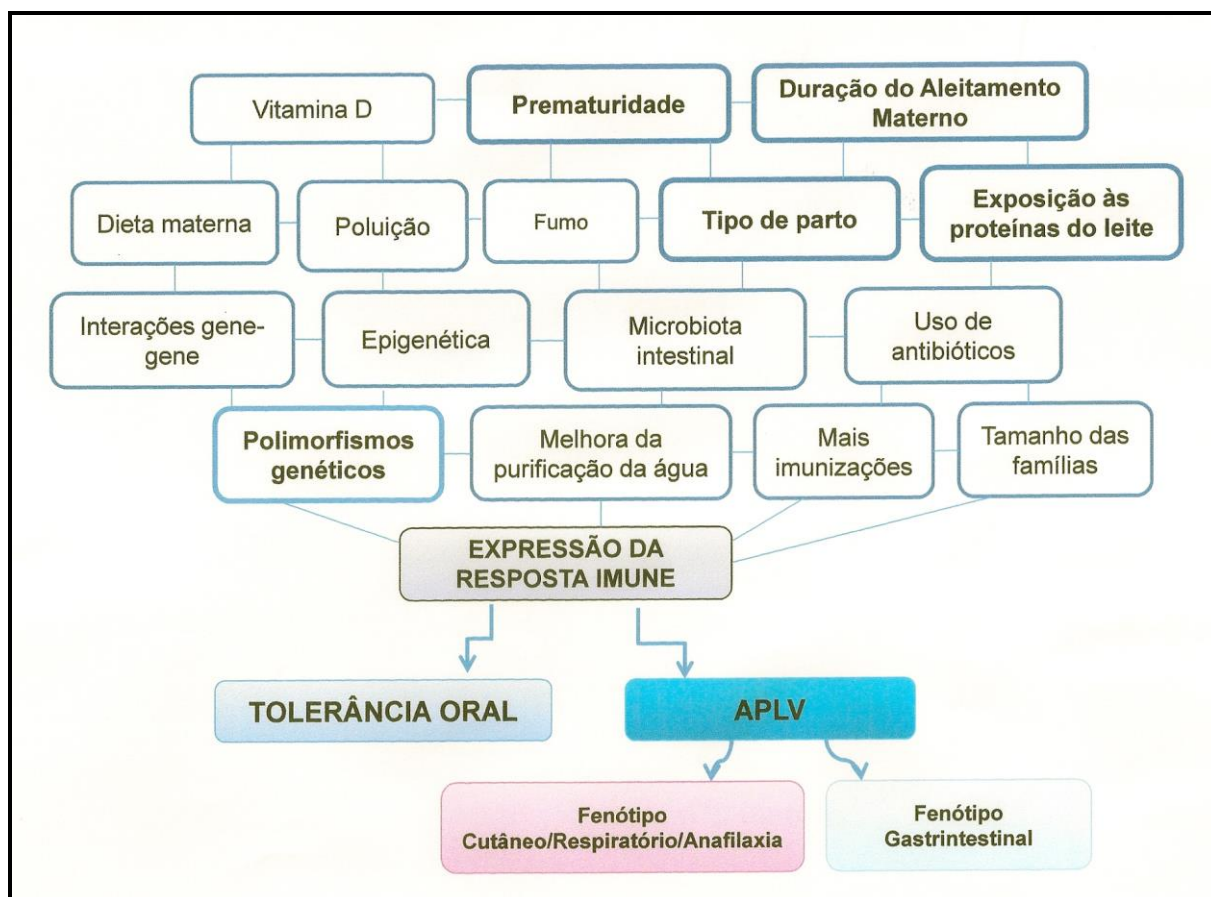
É sabido que a APLV ocorre em indivíduos geneticamente predispostos como consequência de uma resposta imunológica indesejada (HOST; HALKEN, 2014). A literatura revisada revela que existem múltiplos fatores que podem estar implicados na tolerância oral às



proteínas do leite de vaca, incluindo a interação de fatores naturais e ambientais. Esses fatores influenciam não só o desenvolvimento da sensibilidade mediada por IgE mas também o desenvolvimento de sintomas clínicos em uma variedade de tecidos, incluindo a pele, pulmão, epitélio nasal e intestinal (HOLLOWAY et al., 2010).

A contribuição específica de cada fator na manutenção do equilíbrio da resposta imune, bem como no desencadeamento do quadro clínico de APLV ainda está sob debate. Contudo, é apontado que os fatores genéticos como os polimorfismos do tipo SNP podem estar associados ao desenvolvimento do fenótipo alérgico. Em virtude disto, foi elaborado um modelo explicativo dos fatores que podem estar relacionados com a quebra da tolerância oral e desenvolvimento da APLV na infância, como mostra a figura 3.

**FIGURA 3** – Modelo explicativo dos possíveis fatores relacionados ao desenvolvimento da APLV.



Fonte: criação da autora

## **3 MÉTODOS**

### **3.1 Local e período do estudo**

O estudo está vinculado ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal de Pernambuco (PPGSCA/UFPE) e a coleta de dados foi realizada nos ambulatórios de Gastroenterologia Pediátrica, Alergia e Imunologia Pediátrica e Puericultura do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), localizado na cidade de Recife, considerado um centro de referência no tratamento de crianças com alergias alimentares. A coleta de dados foi realizada entre abril de 2013 a junho de 2015 e as análises de genotipagem foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto do Fígado de Pernambuco (LBM/IFP).

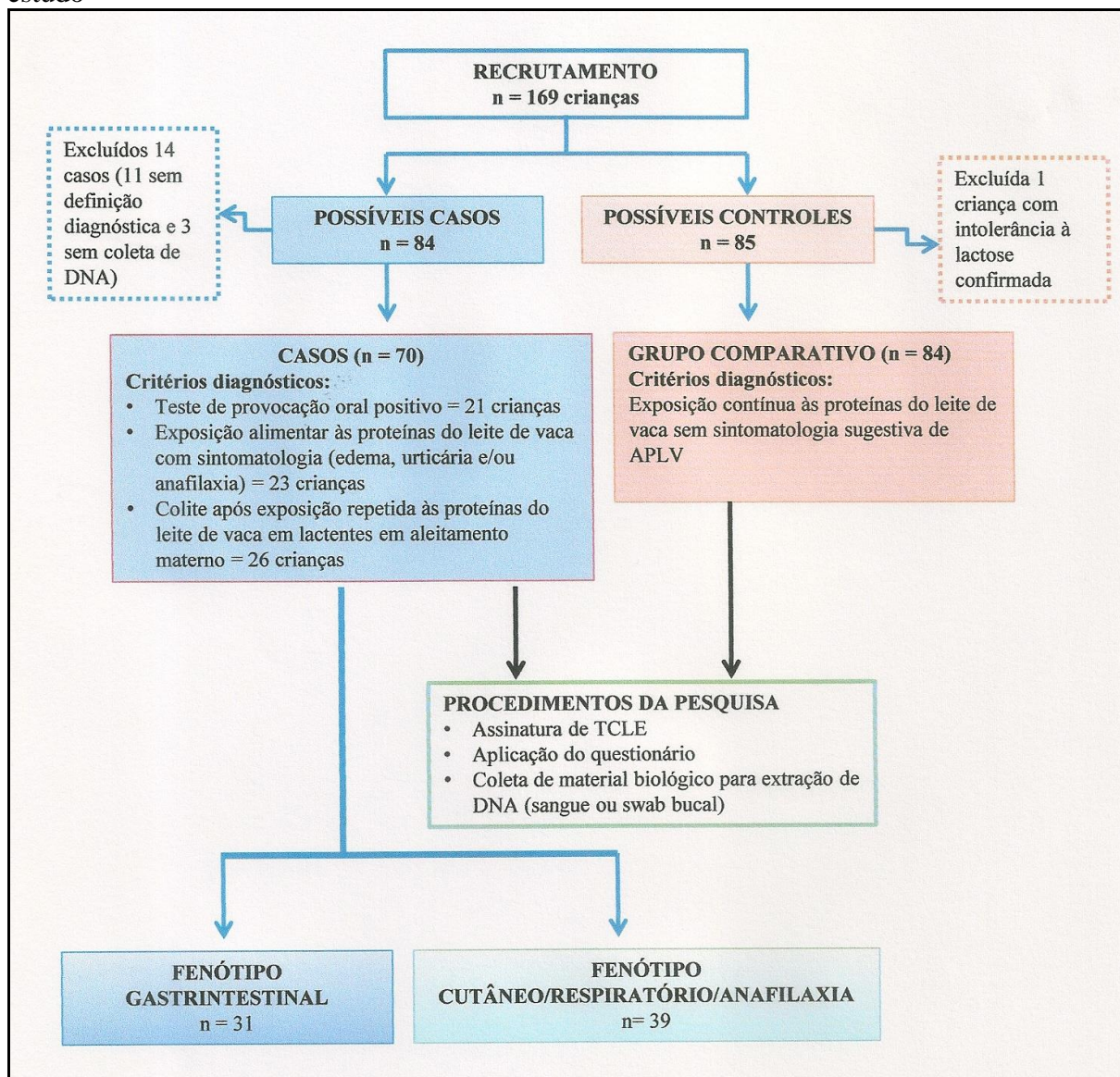
### **3.2 Delineamento do estudo**

Neste estudo foram recrutadas crianças com sintomas atribuídos à APLV e crianças sem sintomatologia relacionada com a ingestão de leite de vaca (grupo comparativo).

### **3.3 Sujeitos do estudo**

Para esse estudo inicialmente foram recrutadas 169 crianças. Destas, 84 apresentavam quadro sugestivo de APLV e 85 não apresentavam sintomatologia relacionada com a exposição às proteínas do leite de vaca. As crianças foram incluídas em cada grupo de acordo com os critérios de elegibilidade estabelecidos para os casos e o grupo comparativo. A figura 4 apresenta o fluxograma com a distribuição dos casos e grupo comparativo.

**FIGURA 4** - Fluxograma da distribuição dos participantes da pesquisa em seus grupos de estudo



### 3.3.1 Definição de casos

Foram incluídas no grupo de casos as crianças que atendiam aos seguintes critérios: idade inferior a dois anos, que apresentaram diagnóstico de APLV através de teste de provocação oral (TPO), exposição repetida às proteínas do leite de vaca com sintomatologia positiva (edema, urticária e/ou anafilaxia) ou diagnóstico médico de colite alérgica após exposição repetida às proteínas do leite de vaca em lactentes em aleitamento materno.

Não foram incluídas no estudo as crianças que possuíam comorbidades (doenças congênitas, neurológicas, genéticas e do trato gastrointestinal como doença inflamatória intestinal, doença celíaca e intolerância à lactose). Das 84 crianças inicialmente recrutadas, foram excluídas 11 crianças sem confirmação diagnóstica e três crianças sem material suficiente para a extração de DNA. Dessa forma, foram incluídas 70 crianças no grupo de casos.

Após a avaliação dos sintomas apresentados pelas crianças, as mesmas foram subdivididas em dois grupos (fenótipos clínicos):

1) Grupo caso com fenótipo gastrointestinal – constituído pelos pacientes com manifestações gastrointestinais: refluxo gastroesofágico, vômitos, constipação intestinal, diarreia com e sem sangue, distensão abdominal e proctite;

2) Grupo caso com fenótipo cutâneo/respiratório/anafilaxia – foram incluídos pacientes com sintomas cutâneos (eritema, prurido, urticária, angioedema e eczema) e/ou respiratórios (tosse, dispneia, estridor, sibilância, prurido nasal, espirros e rinorreia) ou que tenham apresentado quadro de anafilaxia após ingestão ou contato com leite de vaca.

As crianças que apresentaram sintomas mistos (sintomas gastrointestinais tardios e apresentaram reações cutâneas após o TPO para diagnóstico) foram incluídas, para efeito de análise, no grupo com fenótipo cutâneo/respiratório/anafilaxia.

### **3.3.2 Definição de grupo comparativo**

No grupo comparativo foram incluídas crianças com os seguintes critérios: idade inferior a cinco anos, sem sintomas relacionados com a ingestão contínua de leite de vaca e derivados ou portador de outro tipo de alergia alimentar. Os critérios de exclusão foram: portadores de doenças congênitas, neurológicas, genéticas e do trato gastrointestinal como doença inflamatória intestinal, doença celíaca e intolerância à lactose. Das 85 crianças incluídas inicialmente, uma foi excluída após confirmação diagnóstica de intolerância à lactose.

### 3.4 Amostra

A seleção da amostra foi realizada por conveniência, sendo utilizada a demanda espontânea de pacientes que eram atendidos nos ambulatórios de pediatria do HC/UFPE.

### 3.5 Variáveis de estudo

Os participantes da pesquisa foram caracterizados de acordo com as seguintes variáveis:

- a) Variáveis dos pais: escolaridade, renda familiar, idade gestacional, tipo de parto e presença de atopia nos pais;
- b) Variáveis da criança: sexo, peso ao nascer e atual e comprimento atual, duração do aleitamento materno exclusivo, sintomas associados ao consumo de leite de vaca, idade de início dos sintomas, idade na introdução de fórmula infantil, idade que a criança foi exposta ao leite de vaca e não apresentou sintomas e distribuição genotípica dos genes estudados.

O quadro 1 apresenta o tipo, nome utilizado no banco de dados, definição, categorização e resultados permitidos de cada variável.

**QUADRO 1** - Descrição das variáveis de estudo.

Tipo	Nome de codificação no banco de dados	Definição	Categorização	Resultados permitidos
<b>Caracterização da amostra</b>	Sexo	Autoexplicativa	Qualitativa nominal dicotômica	Masculino (1) Feminino (2)
	Faixa etária	Classificada a partir da idade em meses no momento da entrevista	Qualitativa ordinal	<1 ano (1) ≥1 ano (2)
	Escolaridade materna e paterna	Grau de escolaridade da mãe e do pai segundo os anos de estudo	Qualitativa ordinal	Ensino fundamental (1) Ensino médio (2) Ensino superior (3)
	Renda familiar	É definida como o somatório da renda de todos os moradores da casa, tomando-se	Qualitativa ordinal	≤1 salário mínimo (1) >1 salário mínimo (2)

		como base o salário mínimo nacional de R\$ 788,00 estipulado em 29 de dezembro de 2014		
	História de atopia materna e paterna	Presença de doença atópica pelos pais (rinite alérgica, asma, urticária, dermatite atópica, alergia alimentar e medicamentosa)	Qualitativa nominal dicotômica	Sim (1) Não (2)
	Tipo de parto	Via de nascimento da criança	Qualitativa nominal dicotômica	Transvaginal (1) Cesariana (2)
	Idade gestacional	Classificado a partir da semana gestacional no momento do nascimento	Qualitativa ordinal	Pré-termo (<37 semanas) (1) A termo (37 a 41 semanas 6 dias) (2)
	Peso ao nascer	Classificada a partir do peso ao nascimento	Qualitativa ordinal	Baixo peso (<2500g) (1) Peso insuficiente (2500-2999g) (2) Peso adequado ( $\geq 3000$ g) (3)
	Estado nutricional da criança de acordo com o indicador Peso/Idade (P/I)	Classificação do estado nutricional baseado na medida do peso atual (em quilos), levando-se em consideração a idade em meses e o sexo, comparado com o escore Z da Curva de crescimento do indicador P/I da OMS (2006).	Qualitativa ordinal	Baixo peso para a idade (< -2 escore-Z) (1) Peso adequado para a idade ( $\geq -2$ a < +2 escore-Z) (2) Peso elevado para a idade ( $\geq +2$ escore-Z) (3)
	Estado nutricional da criança de acordo com o indicador Estatura/Idade (E/I)	Classificação do estado nutricional baseado na medida da estatura (em centímetros), levando-se em consideração a idade em meses e o sexo, comparado com o escore Z da Curva de crescimento do indicador E/I da OMS (2006).	Qualitativa ordinal	Baixa estatura para a idade (< -2 escore-Z) (1) Estatura adequada para a idade ( $\geq -2$ escore-Z) (2)
	Duração do aleitamento materno exclusivo	Foi considerado como em aleitamento materno exclusivo o lactente que recebe apenas leite materno e não recebe outros líquidos ou alimentos sólidos, com exceção de medicamentos e vitaminas.	Qualitativa ordinal	0 a 3 meses (1) $\geq 4$ meses (2)
	Idade de introdução de fórmula infantil	Idade da criança na época de introdução de fórmula infantil.	Qualitativa ordinal	<1 mês (1) 1-6 meses (2)

<b>Definidora de caso</b>	Fenótipo clínico	Apresentação clínica dos sintomas associados ao diagnóstico de APLV.	Qualitativa nominal multicotômica	Gastrintestinal (1) Cutâneo/respiratório/anafilaxia (2) Grupo comparativo (3)
<b>De análise</b>	Frequência dos genótipos dos SNPs Fok I	Determinação genotípica no gene RVD na posição Fok I.	Qualitativa nominal multicotômica	GG (1) GA (2) AA (3)
	Frequência dos genótipos dos SNPs Taq I	Determinação genotípica no gene RVD na posição Taq I.	Qualitativa nominal multicotômica	AA (1) GA (2) GG (3)
	Frequência dos genótipos dos SNP IL-4 -590 e IL4R	Determinação genotípica dos genes IL-4, na posição -590 e IL-4R.	Qualitativa nominal multicotômica	CC (1) CT (2) TT (3)
	Frequência dos genótipos do SNP IL-10 -1082	Determinação genotípica no gene da IL-10 na posição -1082.	Qualitativa nominal multicotômica	AA (1) GA (2) GG (3)
	Frequência dos genótipos do SNP IL-10 -819	Determinação genotípica no gene da IL-10 na posição -819.	Qualitativa nominal multicotômica	CC (1) TC (2) TT (3)
	Frequência dos genótipos do SNP IL-10 -592	Determinação genotípica no gene da IL-10 na posição -592.	Qualitativa nominal multicotômica	CC (1) AC (2) AA (3)
	Frequência dos genótipos do SNP TGF- $\beta$ 1 -509	Determinação genotípica no gene do TGF- $\beta$ 1 na posição -509.	Qualitativa nominal multicotômica	GG (1) GA (2) AA (3)
	Haplótipos da IL-10	Junção das bases genotípicas das posições -1082, -819 e -592 do gene da IL-10	Qualitativa nominal multicotômica	GCC (1) ACC (2) ATA (3)

### 3.6 Operacionalização da pesquisa

#### 3.6.1 Recrutamento

O recrutamento das crianças foi feito após a realização das consultas nos ambulatórios de Gastroenterologia Pediátrica, Alergia e Imunologia Pediátrica e Puericultura do HC/UFPE.

#### 3.6.2 Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada pela pesquisadora responsável, por uma aluna de mestrado e por duas alunas do Curso de Medicina, bolsistas do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC), sendo uma da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e uma do Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Durante a coleta de dados, as pesquisadoras recrutaram os pacientes, aplicaram os formulários com os pais ou responsáveis pelas crianças e identificaram os tubos com as amostras de sangue e swab dos participantes.

A coleta de sangue foi realizada em laboratório conveniado, por profissional da unidade, tendo em vista que muitas vezes a criança seria submetida à coleta de sangue para a realização de exames solicitados pela equipe médica, e nesse momento eram coletadas duas amostras de sangue para a pesquisa. Uma amostra foi destinada a dosagem da vitamina D (dosagem utilizada na pesquisa de mestrado), que foi realizada no próprio laboratório; a segunda amostra de sangue foi transportada em recipiente térmico até o Laboratório de Biologia Molecular do Instituto do Fígado de Pernambuco (IFP), onde foi armazenada para posterior extração do DNA e genotipagem (determinação dos polimorfismos genéticos).

### **3.6.3 Identificação**

Cada participante da pesquisa foi identificado com um número de três dígitos, na ordem em que foi inserido na pesquisa. Esse número foi utilizado no formulário de coleta de dados da pesquisa e nos tubos de coleta de material biológico (sangue ou swab), bem como as iniciais do nome de cada participante.

### **3.6.4 Coleta, transporte e armazenamento do material biológico**

As crianças foram submetidas a punção venosa de cerca de 5 mL de sangue nas unidades do Laboratório Marcelo Magalhães (laboratório conveniado). Para esse procedimento utilizou-se agulha e tubo para a coleta. Para a determinação dos polimorfismos genéticos utilizou-se tubo para a coleta do tipo micro, com capacidade para 0,8mL, contendo anticoagulante EDTA (do inglês: *Ethylenediamine tetraacetic acid*).

Os tubos contendo EDTA foram acondicionados em uma caixa térmica e transportados até o Laboratório de Biologia Molecular do IFP para a extração do DNA, e armazenados em freezer a temperatura de -20 °C.



Nos casos de impossibilidade de obtenção de amostra de sangue para a extração de DNA foi utilizada a técnica de coleta de células bucais por esfregação com swab estéril sem meio de cultura, sendo realizada em 53 pacientes, correspondendo a 34% da amostra final.

A coleta de células bucais foi realizada pela pesquisadora responsável, nos ambulatorios do HC/UFPE como técnica complementar. A coleta foi feita utilizando-se swab estéril sem meio de cultura, luvas de procedimento descartáveis e tubo plástico estéril. A coleta de células foi obtida esfregando-se levemente a ponta de algodão estéril do swab na mucosa bucal da criança, tanto no lado esquerdo como no lado direito da mucosa (pelo menos cinco vezes em cada lado). A amostra foi acondicionada em tubo plástico estéril, armazenada em caixa térmica contendo gelo químico e transportada até o Laboratório de Biologia Molecular do IFP, onde foi realizada a extração do DNA, em um prazo máximo de 48 horas da coleta. O DNA extraído foi armazenado em freezer a temperatura de -20 °C.

### **3.6.5 Coleta de informações**

#### **3.6.5.1 Formulário**

Na coleta de dados foi utilizado um formulário específico (Apêndice A) contendo informações acerca da identificação da criança quanto ao sexo (masculino e feminino), idade (em meses), do período perinatal (tipo de parto e tempo de gestação) e de lactente (duração do aleitamento materno exclusivo, sintomatologia sugestiva de APLV e a idade de início dos sintomas), além de avaliação do estado nutricional (peso ao nascer e atual e comprimento atual). Também foram coletadas informações acerca do grau de escolaridade dos pais, renda familiar e história de atopia dos pais. No formulário também foi anotado o genótipo para cada gene avaliado.

#### **3.6.5.2 Avaliação nutricional antropométrica**

A avaliação antropométrica foi realizada mediante a aferição do peso (em quilos) e comprimento das crianças (em centímetros) no dia da entrevista para a pesquisa. As aferições de peso e comprimento foram realizadas de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Pediatria (2009). O peso e o comprimento das crianças com idade inferior a dois

anos foram mensurados utilizando-se balança infantil digital, marca Filizola ® e infantômetro horizontal portátil. No caso das crianças com idade igual ou superior a dois anos, utilizou-se balança digital tipo plataforma e fita com haste de metal acoplada à balança.

Para a classificação do estado nutricional utilizou-se os indicadores peso/idade (P/I) e estatura/idade (E/I), propostos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no ano de 2006. O peso e comprimento da criança foram comparados com os valores em escore Z das tabelas de referência, de acordo com a idade e sexo, e a classificação foi feita segundo os pontos de corte propostos pela OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

### **3.6.6 Teste de provocação oral**

O teste de provocação oral (TPO) foi realizado para confirmar o diagnóstico de APLV, em ambiente hospitalar, em 21 crianças. As mães foram orientadas a oferecer dieta de exclusão de leite de vaca e derivados por, no mínimo duas semanas, sendo prescrito o uso de fórmula infantil com proteína extensamente hidrolisada ou fórmula de aminoácidos até o dia do teste. As mães das crianças em aleitamento materno exclusivo foram orientadas a seguir uma dieta de exclusão do leite de vaca e derivados até o dia do teste. Nesses casos, o teste foi realizado com a mãe.

O teste foi realizado da seguinte forma: a) para crianças com reações tardias, foram oferecidas doses progressivas de 1, 3, 10, 30 e 100mL em intervalos de 30 minutos; b) para crianças com reações imediatas, foram oferecidas doses iniciais menores de 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100mL em intervalos de 30 minutos. Se os sintomas não aparecessem durante a observação médica, os pais ou responsáveis pelas crianças foram encorajados a continuar a oferta de leite de vaca em casa, com um mínimo de 200 ml por dia, com consultas periódicas de retorno (KOLETZKO et al., 2012). O TPO foi interrompido sempre que o paciente apresentava sintomas durante a execução do teste (reações imediatas).

Tanto nos casos em que as crianças apresentavam reações imediatas como nos casos em que as crianças apresentavam reações tardias, as crianças foram incluídas em um dos subgrupos de casos, com fenótipo gastrointestinal ou cutâneo/respiratório/anafilaxia.

### **3.6.6.1 Acompanhamento**

As crianças com diagnóstico provável de APLV foram acompanhadas periodicamente, de forma regular, com atendimento por gastroenterologista ou alergologista pediátrico e nutricionista, mantidos em dieta de exclusão de leite de vaca e derivados e usando fórmula infantil para tratamento da APLV.

Os lactentes foram submetidos a novo TPO com leite de vaca para identificar se já adquiriu tolerância ao leite de vaca. O período de realização do TPO foi estipulado pela equipe médica que acompanhava a criança, de acordo com a evolução clínica e exames como as dosagens de IgE específicas para as proteínas do leite de vaca; todas as crianças com APLV foram submetidas a pelo menos seis meses de dieta de exclusão de leite de vaca e derivados antes da realização do referido teste.

Foram consideradas como “sem sintomas” as crianças com APLV que foram submetidas ao TPO com leite de vaca e não apresentaram sintomas ou aquelas que foram expostas às proteínas do leite via leite materno ou alimentação e não apresentaram sintomas ao final de 30 dias.

Foram considerados como portadores de APLV ativa ou “com sintomas” aqueles que foram submetidos ao TPO com leite de vaca com resultado positivo (reprodução de sintomas), bem como os que foram submetidos à exposição acidental ou intencional às proteínas do leite e apresentaram sintomas. Também foram consideradas como portadoras de APLV ativa aquelas crianças que, ao final do período de acompanhamento, não tinham indicação clínica de serem submetidas ao teste com leite de vaca.

### **3.6.7 Polimorfismos genéticos**

A identificação dos polimorfismos genéticos foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto do Fígado de Pernambuco (LBM/IFP).

### 3.6.7.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA das amostras de sangue acondicionadas em tubo com EDTA utilizou-se o kit Wizard Genome (Promega, Madison, MA), conforme instruções do fabricante.

Para a extração de DNA das amostras de swab bucal acondicionadas em tubo plástico estéril sem meio de cultura utilizou-se o kit DNA IQ<sup>TM</sup> System (Promega, Madison, MA), conforme instruções do fabricante.

### 3.6.7.2 Genotipagem

Todos os polimorfismos estudados foram do tipo SNP. A determinação dos SNPs foi realizada por meio da reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real, utilizando sondas fluorogênicas alelo-específicas pré-desenhadas tipo “TaqMan®”. Para a reação de genotipagem foi utilizado Master Mix específico para genotipagem com sondas TaqMan® e plataforma de PCR em tempo real ABI PRISM (7500) (Applied Biosystems, Warrington, UK).

A escolha dos SNPs utilizados nesse estudo foi realizada com base em um levantamento bibliográfico, no qual foram relacionados os resultados de pesquisas publicadas nos últimos 10 anos abordando polimorfismos no gene de citocinas e no gene dos receptores de vitamina D em pacientes com alergias alimentares.

Para o gene TGF- $\beta$ 1 foi escolhido estudar a posição -509 por se tratar do início da região promotora do gene, que pode interferir no processo de transcrição da proteína e, consequentemente, influenciar na produção da citocina (HOBBS et al., 1998). Para o gene da IL-10, foram escolhidas as posições na região promotora proximal do gene -1082, -819 e -592, amplamente estudadas na literatura pelo potencial em interferir na transcrição gênica. O SNP IL-10 -1082 é o mais estudado, alguns trabalhos associaram os polimorfismos dessa posição aos níveis de IL-10, ao maior risco de alergia alimentar e ao quadro de APLV persistente (JACOB et al., 2013; CHEN et al., 2012). Para o gene da IL-4 foi escolhida a região promotora -590. Essa região é a mais estudada em virtude do potencial para interferir na expressão do gene e, consequentemente, na produção da IL-4 (HUANG; ZHONG; WU, 2012). Para o gene

do seu receptor (IL-4R) foi escolhida a posição rs3024547, com base nos resultados de estudo que mostra um papel desse SNP no aumento de IgE (HONG et al., 2011). Para o gene VDR foram escolhidos os SNP Fok I e Taq I. O SNP Fok I, localizado próximo a região onde é iniciada a transcrição do gene (região 5' UTR), é o mais estudado na literatura devido ao seu potencial para influenciar no tamanho da proteína produzida e, possivelmente causar mudanças funcionais nos receptores de vitamina D (ETTEN et al., 2007). O SNP Taq I é localizado próximo ao fim da transcrição (região 3'UTR) e estudos mostraram associação entre polimorfismos dessa região e maior risco de alergia alimentar em crianças (SENTSOVA et al., 2014; KITANAKA et al., 2012).

O quadro 2 apresenta os SNP estudados e sua localização cromossômica.

Uma vez que os polimorfismos do gene IL-10 nas posições -819 e -592 estão em desequilíbrio de ligação completa em relação ao SNP -1082, os genótipos da posição -592 foram determinados por inferência. Foram construídos os haplótipos da IL-10 nas posições -1082, -819 e -592, a partir dos genótipos de cada posição cromossômica. Os haplótipos formados foram GCC, ACC e ATA.

**QUADRO 2** – Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) avaliados na pesquisa

Genes	Locus cromossômico	SNPs
TGF- $\beta$ 1 (-509)	19q13.2	rs1800469
IL-10 (-819)	1q32.1	rs1800871
IL-10 (-592)	1q32.1	rs1800872
IL-10 (-1082)	1q32.1	rs1800896
IL-4 (-590)	5q31.1	rs2243250
IL-4R	16p12.1	rs3024547
RVD (Fok I)	12q13.1	rs2228570
RVD (Taq I)	12q13.1	rs731236

### 3.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

O teste de *Kolmogorov Smirnov* foi usado para verificar a distribuição normal da variável idade. A idade no período de início dos sintomas e no período do TPO para identificar se já adquiriu tolerância não apresentaram distribuição normal, sendo expressas em mediana. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparar as medianas de idade entre os dois grupos de fenótipos clínicos.

As variáveis categóricas como a distribuição dos genótipos e alelos dos genes estudados (IL-10, TGF- $\beta$ 1, IL-4, IL-4R e VDR) e a variável definidora de caso foram comparadas entre os grupos avaliados com a aplicação do teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando apropriado.

Foi utilizado o software ARLEQUIN, versão 3.11 (Berna, Suíça) para a construção dos haplótipos da IL-10 nas posições -1082, -819 e -592. Também foi verificado o equilíbrio de Hardy-Weinberg, com auxílio do software, para todos os polimorfismos analisados, e todos os polimorfismos apresentaram equilíbrio na distribuição.

Análise de regressão logística multivariada foi realizada para determinar os fatores (se hereditários ou ambientais) que podem ter contribuído para a ocorrência de APLV na amostra, bem como para os fenótipos clínicos. As variáveis do formulário referentes ao período neonatal e do lactente e os polimorfismos genéticos que apresentaram  $p < 0,20$  entre o grupo com APLV e o grupo comparativo e entre cada grupo de fenótipo clínico e o grupo comparativo foram selecionados para construir um modelo explicativo para possíveis preditores da APLV e das apresentações fenotípicas. Os testes estatísticos foram bicaudais, e foram considerados significantes quando o valor de  $p$  foi inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

### **3.8 Considerações éticas**

Este projeto de pesquisa foi registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP/Plataforma Brasil e foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, com CAAE sob o número 12878313.4.0000.5208 (Anexo A).

Cabe ressaltar que foram adotados os princípios éticos da resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde, que normatiza as pesquisas que envolvem seres humanos.

Os pais ou responsáveis foram esclarecidos verbalmente sobre os objetivos, operacionalização e aspectos éticos da pesquisa. Dessa forma, aqueles que aceitaram participar assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B).

Durante todo o período de execução da pesquisa, os familiares tiveram acesso facilitado às pesquisadoras por meio de telefones (fixo e celular), bem como pessoalmente nos dias das consultas agendadas de retorno aos ambulatórios. Este estudo não acarretou em nenhum custo financeiro ao responsável pelas crianças, como também não possui fins lucrativos. Os pais ou responsáveis das crianças poderiam desistir da participação da pesquisa em qualquer momento sem que isso acarretasse em prejuízo ao acompanhamento clínico da criança.

### **3.9 Recursos financeiros**

Este projeto recebeu financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio de auxílio financeiro do edital universal de 2012/2013, sob o número de registro 488488/2013-3.

### **3.10 Problemas metodológicos e limitações**

A confirmação do diagnóstico de APLV de forma padronizada foi um dos principais problemas encontrados nesse estudo, devido à dificuldade em realizar o teste de provocação oral em vários pacientes. O teste não foi indicado pela equipe médica nos casos em que as crianças apresentaram reações potencialmente graves como anafilaxia, bem como nos casos de sangramento persistente nas fezes associado à dificuldade de ganho de peso. Esses pacientes foram classificados como portadores de APVL por critérios clínicos, de acordo com o consenso da equipe médica que acompanhou a criança.

Segundo a *European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN) e a WAO, o TPO pode ser dispensado nas situações em que o risco é maior que o benefício de realizar o teste, a exemplo, nas crianças que apresentam urticária aguda, angioedema, estridor, sibilos ou anafilaxia imediatamente ou após duas horas da

ingestão de produtos lácteos, associado a um teste de IgE positivo para proteínas do leite de vaca (KOLETZKO, 2012; FIOCCHI et al., 2010).

Portanto, o diagnóstico de APLV nos participantes pode ter sido superestimado devido a não realização do TPO em alguns pacientes. Vale considerar que os pacientes preencheram os critérios para omissão do teste de acordo com os *Guidelines* vigentes.

Outro problema metodológico foi a dificuldade em classificar os casos em subgrupos de fenótipos clínicos porque muitas vezes os sintomas apresentados pelas crianças eram comuns aos dois fenótipos clínicos (gastrointestinal e cutâneo/respiratório/anafilaxia), o que pode ter ocasionado em viés de seleção. No entanto, tentando-se minimizar esse risco, foi considerada a classificação do tipo de fenótipo clínico anotado no prontuário da criança e, em caso de dúvidas foram considerados também os resultados de exames complementares solicitados pela equipe médica como as dosagens das IgE específicas para as proteínas do leite e testes de hipersensibilidade imediata.

Identificou-se que as crianças com APLV apresentaram um perfil socioeconômico superior em comparação às crianças do grupo comparativo, o que tornou os grupos não homogêneos. Acredita-se que esse achado seja atribuído ao local da coleta de dados, que é um hospital público considerado como centro de referência no atendimento a crianças com alergia alimentar, o que acarreta em grande procura de atendimento para a obtenção de laudo médico para aquisição das fórmulas infantis para tratamento da APLV, até mesmo por famílias com elevado poder aquisitivo.

Outro problema identificado foi a diferença nas idades das crianças entre o grupo de casos e o grupo comparativo, o que contribuiu para a não homogeneidade quanto a esse aspecto. Essa diferença se deve a dificuldade em captar crianças saudáveis menores de dois anos em virtude da recusa de muitos pais/responsáveis pela necessidade de coleta de sangue para extração de DNA. Por isso, foi aumentado o critério de idade para inferior a cinco anos para inclusão no grupo comparativo, tendo em vista que a idade não influencia na determinação dos polimorfismos genéticos.

Foi necessário instituir uma técnica complementar para obtenção de DNA dos pacientes, em virtude de se tratar de uma amostra de lactentes e crianças menores de cinco anos, que possuem vasos sanguíneos de fino calibre, o que dificultou o acesso venoso e, em alguns casos, a quantidade de sangue obtida foi insuficiente. Por isso, optou-se como alternativa, incluir uma técnica adicional de extração de DNA, a coleta de células bucais por esfregaço com swab estéril. Essa técnica é prática, menos invasiva, reconhecida e amplamente utilizada cotidianamente para extração de DNA, e permitiu aumentar a amostra, porém,



também aumentou os custos da pesquisa. Foi coletado sangue ou células bucais para a extração do DNA das 154 crianças que participaram do estudo, no entanto, em alguns pacientes a quantidade de DNA extraída foi insuficiente para a genotipagem dos oito polimorfismos estudados. As perdas foram maiores para os polimorfismos do gene IL-10 (-1082, -819 e -592), o que pode ter influenciado nos resultados encontrados, principalmente para esse gene. No quadro 3 estão relacionadas as perdas de genótipos.

**QUADRO 3 – Perdas de genotipagem**

Genes	Perdas	
	n= 154	%
TGF- $\beta$ 1 (-509)	06	04
IL-10 (-819)	29	19
IL-10 (-592)	29	19
IL-10 (-1082)	29	19
RVD (Taq I)	05	03

Outro problema identificado foi a escassez de estudos com enfoque em polimorfismos genéticos das citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ), dos genes IL-4, IL-4R e VDR em crianças com alergias alimentares, principalmente com APLV, o que dificulta a comparação dos resultados encontrados. Foi encontrado apenas um artigo publicado estudando os polimorfismos do gene VDR na área de alergia alimentar.

O tamanho da nossa amostra foi compatível com as de outras pesquisas, principalmente quando foram avaliados pacientes com APLV. Contudo, a amostra foi considerada pequena para um estudo genético. Estudos que avaliam variabilidade genética, geralmente necessitam de grandes amostras populacionais para identificar as variações que muitas vezes estão presentes em um percentual reduzido de indivíduos.

A ausência de associação entre os polimorfismos genéticos e a APLV e entre os seus fenótipos clínicos pode ser resultante do tamanho pequeno da amostra, das perdas de genotipagem, ou provavelmente do menor efeito desses polimorfismos sobre a suscetibilidade para o desenvolvimento dessa enfermidade, tendo em vista a ampla gama de fatores que podem influenciar na expressão gênica e manifestação do fenótipo alérgico.

Em nosso estudo não foi avaliada a expressão gênica, o que limita a interpretação do papel funcional dos polimorfismos identificados em cada paciente. Também não foram

dosados os níveis séricos das citocinas as quais os polimorfismos foram identificados, o que também poderia limitar a interpretação dos resultados encontrados.

É importante considerar que outros genes também estão implicados na resposta imunológica e não foram incluídos nesta pesquisa, a exemplo dos genes relacionados com a imunidade inata (INF- $\gamma$  e IL-12), resposta inflamatória (IL-2, IL-3, IL-5, e IL-13), resposta tolerogênica (fator transcricional FoxP3). Da mesma forma, também não foram incluídos outros genes relacionados com a atividade metabólica da vitamina D, a exemplo o gene CYP27B1. É possível que os polimorfismos desses genes possam ter um papel na patogênese da APLV. No entanto, o número reduzido de publicações sobre os polimorfismos desses genes em pacientes com alergias alimentares contribuiu para que não fossem escolhidos para esta pesquisa.

As variáveis identificadas como possíveis preditoras da ocorrência de APLV e dos seus fenótipos clínicos podem não refletir de forma fidedigna os principais fatores que são implicados no aumento da chance para os lactentes desenvolverem esta enfermidade. É possível que outras variáveis, que não foram avaliadas neste estudo, possuam um efeito maior sobre a gênese da APLV na população estudada. Vale destacar também que os relatos dos pais/responsáveis são dependentes da memória, e que em situações de forte emoção, como nos casos de doenças nos filhos, esta pode ser comprometida e, conseqüentemente, pode influenciar nas informações relatadas.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização geral da amostra

Foram avaliadas 154 crianças. Destas, 70 foram diagnosticadas com APLV (casos) e 84 eram saudáveis (grupo comparativo). As crianças com APLV e saudáveis apresentaram mediana de idade igual a sete e 16,5 meses, respectivamente.

A tabela 1 apresenta as características gerais da amostra. O grupo com APLV apresentou maior proporção de crianças menores de um ano de idade (68,6% *vs* 35,7%), nascidos através de cesariana (85,7% *vs* 67,9%), com pais e mães com nível de escolaridade mais elevada e maior frequência de mães com história positiva para atopia (55,7% *vs* 33,3%), em relação ao grupo comparativo.

**TABELA 1** - Características pessoais e familiares de lactentes com alergia às proteínas do leite de vaca e grupo comparativo.

VARIÁVEIS	APLV		GRUPO COMPARATIVO		p*
	n= 70	%	n= 84	%	
<b>Sexo</b>					
Masculino	36	51,4	41	48,8	0,746
Feminino	34	48,6	43	51,2	
<b>Faixa etária</b>					
<1 ano	48	68,6	30	35,7	<b>0,000</b>
≥1 ano	22	31,4	54	64,3	
<b>Idade gestacional</b>					
Prematuro	11	15,7	08	9,5	0,245
A termo	59	84,3	76	90,5	
<b>Tipo de parto</b>					
Transvaginal	10	14,3	27	32,1	<b>0,010</b>
Cesariana	60	85,7	57	67,9	
<b>Duração do aleitamento materno exclusivo</b>					
0-3 meses	41	58,6	37	44,0	0,073
≥4 meses	29	41,4	47	56,0	
<b>Idade na introdução de fórmula infantil</b>					
<1 mês	20	28,6	16	19,0	0,164
1-6 meses	50	71,4	68	81,0	
<b>Renda familiar<sup>a</sup></b>					
≤1 salário mínimo	15	22,1	22	27,8	0,420
>1 salário mínimo	53	77,9	57	72,2	
<b>Escolaridade materna</b>					
Ensino fundamental	04	5,7	15	17,9	<b>0,001</b>
Ensino médio	24	34,3	42	50,0	
Ensino superior	42	60,0	27	32,1	
<b>Escolaridade paterna<sup>b</sup></b>					
Ensino fundamental	05	7,4	16	20,0	<b>0,002</b>
Ensino médio	28	41,2	44	55,0	
Ensino superior	35	51,4	20	25,0	
<b>Atopia materna</b>					
Sim	39	55,7	28	33,3	<b>0,005</b>
Não	31	44,3	56	66,7	
<b>Atopia paterna<sup>c</sup></b>					
Sim	27	39,7	31	37,8	0,812
Não	41	60,3	51	62,2	
<b>Peso ao nascer<sup>b</sup></b>					
Baixo peso	08	11,8	09	11,3	0,877
Peso insuficiente	14	20,6	14	17,5	
Peso adequado	46	67,6	57	71,2	
<b>Estado nutricional atual segundo Peso/Idade<sup>d</sup></b>					
Baixo peso	03	4,5	01	1,6	0,634
Peso adequado	63	94,0	61	96,8	
Peso elevado	01	1,5	01	1,6	
<b>Estado nutricional atual segundo Estatura/Idade<sup>e</sup></b>					
Baixa estatura	05	8,1	03	5,0	0,494
Estatura adequada	57	91,9	57	95,0	

APLV= Alergia às proteínas do leite de vaca; \*Teste Qui-quadrado; <sup>a</sup>6 valores perdidos (1 caso e 5 controles); <sup>b</sup>6 valores perdidos (2 casos e 4 controles); <sup>c</sup>4 valores perdidos (2 casos e 2 controles); <sup>d</sup>24 valores perdidos (3 casos e 21 controles); <sup>e</sup>32 valores perdidos (8 casos e 24 controles)

#### 4.2 Polimorfismos dos genes das citocinas regulatórias (TGF- $\beta$ 1 e IL-10)

Na tabela 2 é apresentada a distribuição dos genótipos e alelos do gene TGF- $\beta$ 1 (-509). Não houve diferença significativa nos genótipos e alelos entre os casos totais e o grupo comparativo, bem como não houve diferença nas distribuições entre os grupos de fenótipos clínicos e o grupo comparativo. Contudo, embora não significativa, observa-se no grupo casos totais uma prevalência do genótipo heterozigoto CT, enquanto no grupo comparativo é prevalente o genótipo homozigoto selvagem CC ( $p=0,124$ ).

**TABELA 2** - Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos do gene TGF- $\beta$ 1 em crianças com APLV, de acordo com os fenótipos clínicos e no grupo comparativo.

	Fenótipos Clínicos				Casos Totais		Grupo Comparativo		p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>
	Gastrintestinal		Cutâneo/ Respiratório/ Anafilaxia							
	n= 31	%	n= 39	%	n= 70	%	n= 84	%		
TGF-β1 -509										
Genótipo <sup>a</sup>										
CC	09	31,0	18	47,4	27	40,3	41	50,6	0,124	0,201
CT	17	58,6	17	44,7	34	50,7	28	34,6		
TT	03	10,4	03	7,9	06	9,0	12	14,8		
Alelos										
C	35	60,3	53	69,7	88	65,7	110	67,9	0,685	0,478
T	23	39,7	23	30,3	46	34,3	52	32,1		

$p^1$  Teste Qui-quadrado (casos totais vs grupo comparativo)

$p^2$  Teste Qui-quadrado (fenótipos clínicos vs grupo comparativo)

<sup>a</sup>6 valores perdidos (3 casos e 3 controles)

Na tabela 3 é apresentada a distribuição dos polimorfismos do gene IL-10. Pode-se observar que não houve diferença significativa nas distribuições genotípicas e alélicas para os SNPs -1082, -891 e -592. Da mesma forma, não foi detectada diferença na distribuição dos haplótipos formados a partir dos genótipos das posições -1082/-819/-592 do gene IL-10, quando avaliados os casos totais em relação ao grupo comparativo, bem como quando comparados os grupos de fenótipos clínicos e o grupo comparativo. No entanto, observa-se que o grupo cutâneo/respiratório/anafilaxia apresentou maior proporção do genótipo variante TT e AA para as posições -819 e -592, em relação ao grupo gastrintestinal e o grupo comparativo, respectivamente (35,3% vs 8,3% vs 26,9%;  $p=0,082$ ).

**TABELA 3** - Frequência genotípica, alélica e haplotípica do gene IL-10 em crianças com APLV, de acordo com os fenótipos clínicos e no grupo comparativo.

	Fenótipos Clínicos				Casos Totais		Grupo Comparativo		p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>
	Gastrintestinal		Cutâneo/ Respiratório/ Anafilaxia		n= 70	%	n= 84	%		
	n= 31	%	n= 39	%						
<b>IL-10 -1082</b>										
<b>Genótipo<sup>a</sup></b>										
AA	09	37,5	18	52,9	27	46,6	33	49,3	0,375	0,496
GA	10	41,7	11	32,4	21	36,2	28	41,8		
GG	05	20,8	05	14,7	10	17,2	06	9,0		
<b>Alelos</b>										
A	28	58,3	47	69,1	75	64,7	94	70,2	0,355	0,309
G	20	41,7	21	30,9	41	35,3	40	29,8		
<b>IL-10 -819</b>										
<b>Genótipo<sup>a</sup></b>										
CC	08	33,3	09	26,5	17	29,3	27	40,3	0,266	0,082
CT	14	58,4	13	38,2	27	46,6	22	32,8		
TT	02	8,3	12	35,3	14	24,1	18	26,9		
<b>Alelos</b>										
C	30	62,5	31	45,6	61	52,6	76	56,7	0,513	0,159
T	18	37,5	37	54,4	55	47,4	58	43,3		
<b>IL-10 -592</b>										
<b>Genótipo<sup>a</sup></b>										
CC	08	33,3	09	26,5	17	29,3	27	40,3	0,266	0,082
AC	14	58,4	13	38,2	27	46,6	22	32,8		
AA	02	8,3	12	35,3	14	24,1	18	26,9		
<b>Alelos</b>										
C	30	62,5	31	45,6	61	52,6	76	56,7	0,513	0,159
A	18	37,5	37	54,4	55	47,4	58	43,3		
<b>Haplótipos do gene IL-10 (1082/819/592)</b>										
GCC	20	41,7	21	30,9	41	35,3	40	29,9	0,184	0,156
ACC	10	20,8	10	14,7	20	17,2	36	26,9		
ATA	18	37,5	37	54,4	55	47,4	58	43,2		

p<sup>1</sup> Teste Qui-quadrado (casos totais vs grupo comparativo)

p<sup>2</sup> Teste Qui-quadrado (fenótipos clínicos vs grupo comparativo)

<sup>a</sup>29 valores perdidos (12 casos e 17 controles)

### 4.3 Polimorfismos dos genes IL-4 e IL-4R

Na tabela 4 é mostrada a distribuição dos polimorfismos dos genes IL-4 e IL-4R. Não foi encontrada diferença significativa nas frequências dos genótipos e alelos para os genes IL-4 (-590) e IL-4R entre os grupos de fenótipos clínicos da APLV e o grupo comparativo, bem como entre os casos totais e o grupo comparativo. Contudo, em relação ao gene IL-4 (-590),

embora não tenha sido detectada diferença estatística, observa-se que o grupo comparativo apresentou maior proporção do alelo variante T em relação ao grupo casos totais (36,3% vs 27,1%;  $p=0,086$ ). Pode ser destacado também que apenas o grupo comparativo apresentou o genótipo variante TT para o gene IL-4R.

**TABELA 4** - Frequência genotípica e alélica dos genes IL-4 e IL-4R em crianças com APLV, de acordo com os fenótipos clínicos e no grupo comparativo.

	Fenótipos Clínicos				Casos Totais		Grupo Comparativo		p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>
	Gastrintestinal		Cutâneo/ Respiratório/ Anafilaxia		n= 70	%	n= 84	%		
	n= 31	%	n= 39	%						
<b>IL-4 -590</b>										
<b>Genótipo</b>										
CC	17	54,8	23	59,0	40	57,1	35	41,7	0,157	0,231
CT	12	38,7	10	25,6	22	31,4	37	44,0		
TT	02	6,5	06	15,4	08	11,5	12	14,3		
<b>Alelos</b>										
C	46	74,2	56	71,8	102	72,9	107	63,7	0,086	0,219
T	16	25,8	22	28,2	38	27,1	61	36,3		
<b>IL-4R</b>										
<b>rs3024547</b>										
<b>Genótipo</b>										
CC	18	58,1	22	56,4	40	57,1	51	60,7	0,128	0,389
CT	13	41,9	17	43,6	30	42,9	29	34,5		
TT	0	0	0	0	0	0	04	4,8		
<b>Alelos</b>										
C	49	79,0	61	78,2	110	78,6	131	78,0	0,900	0,985
T	13	21,0	17	21,8	30	21,4	37	22,0		

p<sup>1</sup> Teste Qui-quadrado (casos totais vs grupo comparativo)

p<sup>2</sup> Teste Qui-quadrado (fenótipos clínicos vs grupo comparativo)

#### **4.4 Polimorfismos do gene do receptor de vitamina D**

Na tabela 5 são apresentados os polimorfismos do gene VDR nas posições Fok I e Taq I. Não foi encontrada diferença estatística significativa na distribuição dos genótipos e alelos para os dois SNPs entre os casos totais e o grupo comparativo e entre os grupos de fenótipos clínicos e o grupo comparativo.

**TABELA 5** - Frequência genotípica e alélica do gene do receptor de vitamina D em crianças com APLV, de acordo com os fenótipos clínicos e no grupo comparativo.

	Fenótipos Clínicos				Casos Totais		Grupo Comparativo		p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>
	Gastrintestinal		Cutâneo/ Respiratório/ Anafilaxia							
	n= 31	%	n= 39	%	n= 70	%	n= 84	%		
<b>VDR Fok I</b>										
<b>Genótipo</b>										
CC	15	48,4	24	61,5	39	55,7	43	51,2	0,722	0,720
CT	13	41,9	11	28,2	24	34,3	34	40,5		
TT	03	9,7	04	10,3	07	10,0	07	8,3		
<b>Alelos</b>										
C	43	69,3	59	75,6	102	72,9	120	71,4	0,781	0,685
T	19	30,7	19	24,4	38	27,1	48	28,6		
<b>VDR Taq I</b>										
<b>Genótipo<sup>a</sup></b>										
TT	14	46,7	15	38,5	29	42,0	33	41,3	0,945	0,965
TC	18	46,7	21	53,8	35	50,7	40	50,0		
CC	02	6,6	03	7,7	05	7,3	07	8,7		
<b>Alelos</b>										
T	46	67,7	51	65,4	93	67,4	106	66,3	0,835	0,958
C	22	32,3	27	34,6	45	32,6	54	33,7		

VDR = Receptor de vitamina D

p<sup>1</sup> Teste Qui-quadrado (casos totais vs grupo comparativo)

p<sup>2</sup> Teste Qui-quadrado (fenótipos clínicos vs grupo comparativo)

<sup>a</sup>5 valores perdidos (1 caso e 4 controles)

#### 4.5 Características das crianças com APLV

Das 70 crianças com APLV, 31 (44,3%) foram classificadas como portadoras de sintomas predominantemente gastrintestinais e 39 (55,7%) com manifestação de sintomas cutâneos/respiratórios/anafilaxia.

A tabela 6 apresenta as características das crianças com APLV estratificadas por fenótipo clínico. Observa-se que o grupo gastrintestinal apresentou maior proporção de crianças com menor duração de aleitamento materno exclusivo, em comparação ao grupo com fenótipo cutâneo/respiratório/anafilaxia (77,4% vs 43,6%; p= 0,004).



**TABELA 6** – Características das crianças com alergia às proteínas do leite de vaca de acordo com o fenótipo clínico.

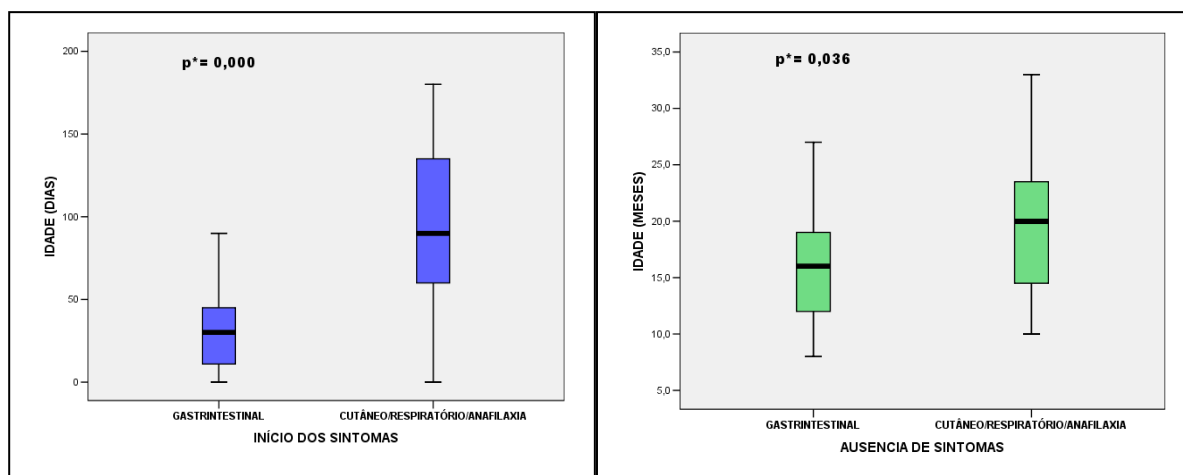
Variáveis	Grupo Gastrintestinal		Grupo Cutâneo/Respiratório/ Anafilaxia		p*
	n= 31	%	n= 39	%	
<b>Sexo</b>					
Masculino	14	45,2	22	56,4	0,350
Feminino	17	54,8	17	43,6	
<b>Idade gestacional</b>					
Prematuro	02	6,5	08	20,5	0,168 <sup>+</sup>
A termo	29	93,5	31	79,5	
<b>Tipo de parto</b>					
Transvaginal	05	16,1	05	12,8	0,694
Cesariana	26	83,9	34	87,2	
<b>Peso ao nascer</b>					
Baixo peso	04	13,3	04	10,5	0,796
Peso insuficiente	07	23,3	07	18,4	
Peso adequado	19	63,3	27	71,1	
<b>Duração do aleitamento materno exclusivo</b>					
0-3 meses	24	77,4	17	43,6	<b>0,004</b>
≥4 meses	07	22,6	22	56,4	
<b>Idade na introdução de fórmula infantil</b>					
<1 mês	12	38,7	08	20,5	0,094
1-6 meses	19	61,3	31	79,5	

\*Teste Qui-quadrado; <sup>+</sup>Teste Exato de Fisher

A mediana de idade ao início dos sintomas foi menor no grupo gastrintestinal (30 dias vs 90 dias,  $p= 0,000$ ), quando comparado ao grupo cutâneo/respiratório/anafilaxia, como mostrado na Figura 5.

Ao término do estudo, a ausência de sintomas (possível tolerância ao leite de vaca) foi identificada em 29 (41,4%) das 70 crianças com APLV (16 (51,6%) de 31 que pertenciam ao grupo gastrintestinal e 13 (33,3%) de 39 que pertenciam ao grupo cutâneo/respiratório/anafilaxia). Foi identificada ausência de sintomas através do TPO em 16 crianças, e 13 crianças foram submetidas à exposição doméstica às proteínas do leite de vaca. A mediana de idade nesse período foi menor no grupo gastrintestinal em comparação ao grupo cutâneo/respiratório/anafilaxia (16 meses vs 20 meses,  $p= 0,036$ ), como apresentado na Figura 5.

**FIGURA 5** – Idade ao início dos sintomas e no período de identificação da ausência de sintomas de APLV, de acordo com o fenótipo clínico.



\*Teste Mann-Whitney

#### 4.6 Análise Multivariada

Para a regressão logística multivariada, foram avaliadas as variáveis que compunham a caracterização da amostra e de análise, comparando-se os casos e controles e os grupos de fenótipos clínicos isoladamente em relação ao grupo controle. As variáveis que apresentaram  $p < 0,20$  foram incluídas nos modelos explicativos. As variáveis: faixa etária, escolaridade materna e escolaridade paterna não foram incluídas nos modelos por serem consideradas potenciais fatores de confusão, em virtude que o local da coleta de dados provavelmente contribuiu para as diferenças significantes dessas variáveis entre os grupos.

Para o modelo explicativo dos possíveis fatores preditores da APLV, foi comparado o grupo APLV em relação ao grupo controle e foram incluídas as co-variáveis:

- Hereditárias: atopia materna, genótipos dos genes IL-4 (-590), IL-4R e TGF- $\beta$  (-509);
- Ambientais: idade na introdução da fórmula infantil, tipo de parto e duração do aleitamento materno exclusivo.

Como mostrado na tabela 7, o parto através de cesariana e a atopia materna foram as variáveis associadas a maior chance para desenvolver APLV no grupo estudado. O aleitamento materno se apresentou no limite da significância estatística.

**TABELA 7** - Regressão logística multivariada para possíveis preditores da ocorrência de alergia às proteínas do leite de vaca em relação ao grupo comparativo.

VARIÁVEIS	APLV	Grupo Comparativo	OR bruto (IC <sub>95%</sub> )	p <sup>1</sup>	OR ajustado <sup>a</sup> (IC <sub>95%</sub> )	p <sup>2</sup>
	n (%)	n (%)				
<i>Ambientais</i>						
<b>Tipo de parto</b>						
Transvaginal	10 (14,3)	27 (32,1)	1,00	<b>0,010</b>	1,00	<b>0,021</b>
Cesariana	60 (85,7)	57 (67,9)	2,84 (1,26 – 6,39)		2,68 (1,16 – 6,20)	
<b>Duração do Aleitamento Materno Exclusivo</b>						
≥4 meses	29 (41,4)	47 (56,0)	1,00	0,073	1,00	0,051
0 a 3 meses	41 (58,6)	37 (44,0)	1,80 (0,95 – 3,41)		1,96 (1,00 – 3,85)	
<i>Hereditárias</i>						
<b>Atopia materna</b>						
Não	31 (44,3)	56 (66,7)	1,00	<b>0,005</b>	1,00	<b>0,010</b>
Sim	39 (55,7)	28 (33,3)	2,52 (1,31 – 4,84)		2,45 (1,00 – 3,85)	

OR = Odds Ratio; IC<sub>95%</sub> = Intervalo de Confiança de 95%; <sup>a</sup>ajustado pelas demais variáveis explicativas; p<sup>1</sup> = valor de p da análise univariada; p<sup>2</sup> = valor de p da análise multivariada

Para a análise dos possíveis preditores para o fenótipo gastrointestinal foram incluídas as co-variáveis:

- Hereditárias: atopia materna, genótipos dos genes TGF-β1 (-509), IL-10 (-819 e -592);
- Ambientais: duração do aleitamento materno exclusivo, tipo de parto e idade na introdução da fórmula infantil.

Pode-se observar que a menor duração do aleitamento materno exclusivo (0-3 meses) e a atopia materna foram associadas a elevação da chance em 4,85 e 3,59 vezes, respectivamente, para o fenótipo clínico gastrointestinal, como mostrado na Tabela 8.

**TABELA 8** - Regressão logística multivariada para possíveis preditores da ocorrência de fenótipo clínico gastrointestinal da alergia às proteínas do leite de vaca.

VARIÁVEIS	Grupo Gastrintestinal n (%)	Grupo Comparativo n (%)	OR bruto (IC <sub>95%</sub> )	p <sup>1</sup>	OR ajustado <sup>a</sup> (IC <sub>95%</sub> )	p <sup>2</sup>
<i>Ambientais</i>						
<i>Duração do Aleitamento Materno Exclusivo</i>						
≥4 meses	07 (22,6)	47 (56,0)	1,00	<b>0,001</b>	1,00	<b>0,006</b>
0 a 3 meses	24 (77,4)	37 (44,0)	4,36 (1,69 – 11,21)		4,85 (1,81 – 13,03)	
<i>Hereditárias</i>						
<i>Atopia materna</i>						
Não	12 (38,7)	56 (66,7)	1,00	<b>0,007</b>	1,00	<b>0,002</b>
Sim	19 (61,3)	28 (33,3)	3,17 (1,35 – 7,43)		3,59 (1,44 – 8,92)	

OR = Odds Ratio; IC<sub>95%</sub> = Intervalo de Confiança de 95%; <sup>a</sup>ajustado pelas demais variáveis explicativas; p<sup>1</sup> = valor de p da análise univariada; p<sup>2</sup> = valor de p da análise multivariada

Para a análise dos possíveis preditores para o fenótipo cutâneo/respiratório/anafilaxia foram incluídas as co-variáveis:

- c) Hereditárias: atopia materna, genótipo do gene IL-4 (-590);
- d) Ambientais: tipo de parto e nascimento.

Neste modelo explicativo, observa-se que apenas o nascimento através de cesariana e o nascer prematuro foram associados com aumento da chance para o fenótipo clínico de reações cutâneas/respiratórias/anafilaxia em 3,50 e 3,19 vezes, respectivamente, como mostrado na Tabela 9.

**TABELA 9** - Regressão logística multivariada para possíveis preditores da ocorrência de fenótipo clínico cutâneo/respiratório/anafilaxia da alergia às proteínas do leite de vaca.

VARIÁVEIS	Grupo Cutâneo/ Respiratório/ Anafilaxia n (%)	Grupo Comparativo n (%)	OR bruto (IC <sub>95%</sub> )	p <sup>1</sup>	OR ajustado <sup>a</sup> (IC <sub>95%</sub> )	p <sup>2</sup>
<i>Ambientais</i>						
<b>Tipo de parto</b>						
Transvaginal	05 (12,8)	27 (32,1)	1,00	<b>0,023</b>	1,00	<b>0,022</b>
Cesariana	34 (87,2)	57 (67,9)	3,22 (1,13 – 9,15)		3,50 (1,20 – 10,23)	
<b>Nascimento</b>						
A termo	30 (76,9)	76 (90,5)	1,00	<b>0,043</b>	1,00	<b>0,037</b>
Prematuro	09 (23,1)	08 (9,5)	2,85 (1,00 – 8,08)		3,19 (1,07 – 9,49)	

OR = Odds Ratio; IC<sub>95%</sub> = Intervalo de Confiança de 95%; <sup>a</sup>ajustado pelas demais variáveis explicativas; p<sup>1</sup> = valor de p da análise univariada; p<sup>2</sup> = valor de p da análise multivariada

## 5 DISCUSSÃO

A APLV é uma enfermidade característica da infância, com elevada prevalência no primeiro ano de vida, sendo atribuída ao fato do leite de vaca ser um dos primeiros alimentos introduzidos na dieta complementar do lactente (DE GREEF et al., 2012; DU TOIT et al., 2010). Em adição, nesta fase precoce da vida da criança o sistema imune é relativamente imaturo e suscetível a desenvolver resposta alérgica contra antígenos ambientais como as proteínas alimentares (CRITTENDEN; BENNETT, 2005).

Na presente pesquisa, o grupo de crianças com APLV apresentou mediana de idade igual a sete meses e foi igualmente prevalente em ambos os sexos. O grupo de crianças com APLV foi estratificado por fenótipo clínico de sintomas, em dois tipos fundamentais, de acordo com o possível mecanismo imunológico envolvido: grupo gastrointestinal (reações não mediadas por IgE) e grupo cutâneo/respiratório/anafilaxia (reações mediadas por IgE). Esses grupos foram avaliados em relação às características pessoais, clínicas e aos polimorfismos genéticos.

Sabe-se que há uma miríade de fatores que podem estar implicados na gênese dessa doença complexa. Porém, hipóteses atuais que buscam explicar a distribuição das alergias alimentares apontam para a interação de fatores que incluem polimorfismos genéticos específicos, a natureza dos alérgenos envolvidos e a exposição única a grandes quantidades de alérgenos alimentares através do intestino (COCHRANE et al., 2009). Sendo assim, a identificação de polimorfismos genéticos pode ser importante para um entendimento mais amplo dessa enfermidade. Por isso, procuramos estudar os polimorfismos dos genes das citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ 1), da citocina inflamatória do tipo Th2 mais estudada (IL-4) e o seu receptor (IL-4R) e do receptor de vitamina D.

### **5.1 Polimorfismos dos genes das citocinas regulatórias, inflamatória e do receptor de vitamina D**

A resposta imune tolerogênica é dependente da produção de células Treg, e muitas delas suprimem a diferenciação de células T para o perfil Th1 e Th2 através da secreção das citocinas TGF- $\beta$  e IL-10 (NGOC et al., 2005). Segundo Alam (1994), a citocina TGF- $\beta$

desempenha um papel crucial na resposta imunológica, podendo ajudar a prevenir o desenvolvimento de inflamação alérgica pela sua capacidade em inibir a síntese de IgE e a proliferação de mastócitos. Devido a essa importante ação, especula-se que as variações na região promotora do gene dessa citocina poderiam estar relacionadas à maior suscetibilidade para doenças alérgicas ou a persistência dos sintomas.

É apontada associação entre os polimorfismos do gene TGF- $\beta$ 1 e asma. Uma meta-análise relata que o SNP -509(C/T) pode ser um fator de risco para asma em adultos (OR= 1,26; IC95%= 1,02-1,56; p= 0.035) e crianças (OR= 1,19; IC95%= 1,01-1,40; p= 0.034), sugerindo que os polimorfismos desse gene podem, de alguma forma, interferir na resposta alérgica (CHE et al., 2014).

Em crianças com APLV mediada por IgE, a homozigose para o alelo C do gene TGF- $\beta$ 1 -509(C/T) foi associada ao fenótipo de APLV persistente (p= 0,047), após análise multivariada (JACOB et al., 2013). É importante destacar que esse estudo selecionou apenas 50 crianças com APLV, que foram subdivididas em 14 tolerantes e 36 persistentes. Portanto, as análises comparativas podem ter sido comprometidas pela amostra reduzida e, consequentemente, pode ter limitado o poder do estudo.

Na presente pesquisa, a tabela 2 apresenta a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos do gene TGF- $\beta$ 1 (-509). Não foi encontrada diferença significativa nas distribuições dos polimorfismos desse gene entre as crianças com APLV e o grupo comparativo. Da mesma forma, as frequências dos genótipos e alelos não se mostraram diferentes entre os fenótipos clínicos e o grupo comparativo.

Algumas pesquisas também não encontram associação entre os polimorfismos do gene TGF- $\beta$ 1 (-509) e a presença de doenças alérgicas em geral (asma, rinite e outras) (FARIA et al., 2008; HEINZMANN et al., 2005; BUČKOVA et al., 2001). Da mesma forma, no estudo realizado com 111 crianças com alergias alimentares e 115 crianças com sensibilização para alérgenos ambientais (grupo controle), também não foi encontrada associação entre os polimorfismos do gene TGF- $\beta$ 1, incluindo a posição -509, e a ocorrência de alergias alimentares (CAMPOS ALBERTO et al., 2008).

As evidências desses estudos sugerem que, embora esta citocina desempenhe um importante papel na tolerância oral, os polimorfismos da região promotora desse gene podem não influenciar de forma significativa a patogênese das alergias alimentares.

A outra citocina produzida pelas células Treg é a IL-10. É relatado na literatura a sua capacidade de inibir a diferenciação de células Th0 para as classes Th1 e Th2, e com isso inibir a produção das citocinas por elas produzidas. Essa ação biológica da IL-10 é atribuída, em grande parte, a sua atuação em bloquear a maturação das células dendríticas que apresentam antígenos às células T virgens e, conseqüentemente, inibem a resposta inflamatória, conferindo a essa citocina um papel regulatório da resposta imune (MOSSER; ZHANG, 2008). Portanto, os polimorfismos do gene desta citocina poderiam conferir uma maior suscetibilidade para doenças alérgicas como as alergias alimentares.

Em estudo conduzido por Chen et al. (2012), não se encontrou diferença nas frequências genotípica e alélica do gene IL-10 (-1082 e -592) entre as 37 crianças com alergia alimentar e 52 controles. Contudo, o genótipo AA para a posição -592 foi associado a menores níveis séricos de IL-10 no grupo com alergia alimentar. Sendo sugerido que esses polimorfismos podem desempenhar um papel crítico na patogênese da doença.

Nesta pesquisa, não foi encontrada diferença significativa nas distribuições dos genótipos e alelos para os três SNPs do gene IL-10 nos grupos estudados. Mas, observou-se que o genótipo AA para o SNP -592 e TT para o SNP -819 foram mais frequentes nas crianças com fenótipo clínico cutâneo/respiratório/anafilaxia, embora não tenha sido detectada diferença estatística.

No estudo desenvolvido por Campos Alberto et al. (2008), citado previamente, não foi encontrada associação entre os polimorfismos do gene IL-10 -819 e alergia alimentar. Porém, o alelo selvagem AA da posição -1082 do gene IL-10 foi associado a um risco aumentado para alergia alimentar (OR= 2,5; IC95%: 1,0 – 6,4). Deve ser destacado que esse estudo utilizou crianças alérgicas como controles, o que compromete a comparação com estudos como o nosso, que incluiu apenas crianças saudáveis como grupo comparativo.

Outras duas pesquisas avaliaram crianças com APLV agrupadas em tolerantes e persistentes. Jacob et al. (2013) encontrou associação entre o genótipo GG para o gene IL-10 -1082 (G/A) e o fenótipo de APLV persistente. Em contraste, em estudo realizado com 148 crianças turcas, os polimorfismos no gene IL-10 -1082, -819 e -592 não apresentaram diferença significativa entre aquelas que desenvolveram tolerância e as que permaneciam com sintomas ao final do estudo (YAVUZ et al., 2013).



Observa-se que os resultados dos estudos que analisam os polimorfismos do gene IL-10 em crianças com alergias alimentares, em geral, não são consistentes e os diferentes desenhos dificultam a comparação entre os dados.

Em relação aos haplótipos formados a partir dos SNPs da região promotora proximal do gene IL-10 (-1082/-819/-592), não foi detectada diferença significativa quando avaliados os casos e o grupo comparativo, bem como entre os fenótipos clínicos da APLV.

Esses haplótipos têm sido relacionados à atividade transcricional do gene, podendo interferir na produção da citocina IL-10. Estudo experimental, com estimulação *in vitro* mostrou associação das variantes GCC, ACC e ATA e a produção da citocina. O haplótipo ATA foi relacionado à menor produção de IL-10 e GCC foi associado à elevada produção (CRAWLEY et al., 1999). Esse achado foi considerado estimulante para estudos clínicos, e esses haplótipos foram implicados no desenvolvimento e no curso de doenças relacionadas com o sistema imune (ZHENG et al., 2014; GADDAM et al., 2012; SHIN et al., 2005; KINGO et al., 2003).

Em estudo realizado por Hayden et al. (2011), com crianças de uma coorte australiana não selecionada, a presença do haplótipo ATA foi associada a aumento nos níveis de citocinas inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) após estimulação *in vitro*, sugerindo um papel desse haplótipo em conferir menor produção de IL-10 e maior resposta inflamatória.

Em pacientes com alergias alimentares, o estudo desses haplótipos ainda é um campo muito pouco explorado, não sendo encontrado estudo similar para comparação. Assim, essa pesquisa foi uma das primeiras a estudar a associação dos haplótipos do gene IL-10 com a APLV. O fato de não ter sido detectada associação sugere que, no contexto clínico, a importância desses haplótipos para a patogênese da APLV nestes pacientes pode ser muito pequena.

Nas alergias alimentares, outra citocina que merece destaque é a IL-4, pelo papel crucial na patogênese da resposta inflamatória alérgica. Essa citocina é responsável pela regulação da diferenciação de células T virgens para o perfil Th2 e induz as células B a produzirem IgE. Sua atuação é dependente da ligação aos seus receptores (NAROZNA et al., 2016). Portanto, as variações nesses genes podem aumentar a suscetibilidade para doenças alérgicas à custa do desequilíbrio na produção da citocina IL-4 e mudança funcional dos seus receptores (BROWN et al., 2012).

O gene dessa citocina inflamatória e do seu receptor também foram incluídos nesta pesquisa, no entanto, não foi observada diferença significativa na distribuição genotípica e alélica para o gene IL-4 (-590) e para o gene IL-4R (rs3024547), quando comparados os casos de APLV e o grupo controle saudável e os grupos de fenótipos clínicos em relação ao grupo controle.

Os estudos avaliando os polimorfismos nos genes IL-4 e IL-4R em paciente com alergias alimentares apresentam desenhos bem distintos, o que dificulta comparações. Brown et al. (2012) não encontraram associação entre as frequências dos polimorfismos do gene IL-4 (-590) nos pacientes com alergias alimentares, separados em IgE positivos (RAST+) e negativos (RAST-).

Negoro et al. (2006), avaliando 176 crianças japonesas sensibilizadas à alérgenos alimentares e 306 controles, não encontraram diferença na distribuição dos genótipos para o gene IL-4 (-590) entre os casos e controles, e também não encontraram associação entre os polimorfismos desse gene e a gravidade dos sintomas. Contudo, encontraram associação entre o genótipo CT e níveis elevados de IgE. Mas, essas crianças com sensibilização alimentar possuíam outras condições alérgicas associadas como asma, rinite e conjuntivite alérgica e 93% apresentavam dermatite atópica.

A interação entre os polimorfismos da região promotora do gene IL-4 e fatores ambientais também está sendo foco de investigação. Liu et al. (2011), apontaram uma possível interação entre os polimorfismos do gene IL-4 (-590) e menores níveis de vitamina D na infância com uma maior chance para sensibilização alimentar. Os autores concluíram que em indivíduos com uma predisposição genética para desenvolver alergia alimentar, quando exposto a condições desfavoráveis como os baixos níveis da vitamina D, apresentam maior chance de desenvolver o quadro de sensibilização/alergia alimentar.

Já é reconhecido que a vitamina D desempenha múltiplas ações no organismo humano, além dos efeitos sobre o metabolismo ósseo (BIKLE, 2009). A vitamina D apresenta um potencial para modular o sistema imunológico tanto para aumentar a resposta com perfil Th2 como para um perfil tolerogênico (HEWISON, 2012; CHAMBERS; HAWRYLOWICZ, 2011; BAEKE et al., 2010). Porém, as ações da vitamina D sob o sistema imunológico são intrigantes e a sua real função no tocante a patogênese da alergia alimentar não está clara e um nexo de causalidade ainda não foi estabelecido (DELLA GIUSTINA et al., 2014).

O gene dos receptores de vitamina D passou a ser alvo de estudos de associação com doenças alérgicas nos últimos anos, tendo em vista a atuação fundamental desses receptores em mediar as ações biológicas dessa vitamina. Dessa forma, as variações no gene desses receptores poderiam influenciar nas funções dessa vitamina, contribuindo para aumentar a suscetibilidade para doenças relacionadas com a imunidade.

Esse gene também foi escolhido como gene candidato nesta pesquisa pelo seu potencial em modular a resposta imune, o que poderia contribuir de forma direta ou indireta para o fenótipo APLV. Portanto, foi investigada a associação entre os polimorfismos Fok I e Taq I do gene VDR e a APLV e as suas apresentações fenotípicas. Porém, não foi detectada diferença estatisticamente significativa nas distribuições desses polimorfismos entre os grupos avaliados, como mostrado na tabela 5.

Foi encontrado apenas um estudo avaliando a frequência dos polimorfismos no gene VDR em crianças com alergia alimentar. Sentsova et al. (2014) avaliaram 59 crianças com alergia alimentar e nove controles. A frequência do alelo A para o gene VDR Bsm I e do alelo C para o gene VDR Taq I foram significativamente maiores nas crianças com alergia alimentar em comparação ao grupo controle. Os autores concluem que os polimorfismos no gene VDR podem estar relacionados com o diagnóstico de alergia alimentar. Porém, deve-se ser destacado que o grupo comparativo se mostrou muito pequeno para se estabelecer qualquer inferência estatística.

Em outras doenças alérgicas, pesquisadores têm encontrado associação entre os polimorfismos no gene VDR e maior suscetibilidade para a doença. Em um estudo meta-análise, os polimorfismos do gene VDR Fok I, Taq I e Apa I foram associados com maior risco para asma, sugerindo-se que esses polimorfismos poderiam ser considerados como biomarcadores para a susceptibilidade à doença (HAN et al., 2016).

Em estudo realizado com 75 crianças asmáticas e 227 controles, foi encontrada uma possível associação entre o estado de suficiência de vitamina D e a presença do alelo C (alelo variante), também conhecido como F, para o gene VDR Fok I e maior exigência de terapia para alcançar o controle da asma, sugerindo que esse polimorfismo pode estar envolvido na resposta ao tratamento (EINISMAN et al., 2015).

Por outro lado, em adolescentes gregos, foi detectada uma associação significativa entre o genótipo TT do gene VDR Taq I com sibilância e asma, apenas naqueles com suficiência de vitamina D ( $>20\text{ng/mL}$ ), mas não em adolescentes com baixos níveis de

vitamina D. Sendo aceito pelos autores que esse polimorfismo pode contribuir para maior susceptibilidade para asma, principalmente sob condições de níveis normais de vitamina D (PAPADOPOULOU et al., 2015).

Em contraste, em estudo de associação dos polimorfismos do gene VDR e dermatite atópica, os SNPs Fok I, Taq I e Apa I não foram associados com o risco para a doença, mas o polimorfismo Bsm I foi associado a aumento do risco na população turca (KILIÇ et al., 2016).

Com base nos achados desses estudos, parece que os polimorfismos do gene VDR podem conferir um papel na etiologia da asma, mas em alergia alimentar muitos estudos populacionais ainda se mostram necessários para que se possa estimar o efeito desses SNPs na patogênese dessa enfermidade.

Na presente pesquisa, as hipóteses de associação entre os polimorfismos genéticos e a APLV e seus fenótipos clínicos não foram confirmadas. É possível que o tamanho da amostra possa ter influenciado nesses resultados, tendo em vista que as variações genéticas que podem aumentar a suscetibilidade a doenças muitas vezes só são detectadas em largas amostras populacionais como observado em estudos de base populacional e multicêntricos. É possível também que os polimorfismos encontrados não confirmem mudança funcional, ou seja, se comportem como polimorfismos neutros em relação a homeostase imune na amostra estudada, não determinando maior suscetibilidade para a APLV.

A interpretação dos resultados dos estudos de marcadores genéticos como os polimorfismos se mostra uma tarefa desafiadora, em virtude que apenas a presença do polimorfismo não determina mudanças funcionais, sendo necessário para isso a expressão gênica e esse aspecto muitas vezes não é contemplado. Além disso, muitos estudos apresentam resultados divergentes, com estratificações diferentes e os critérios diagnósticos de alergias alimentares não são consistentes em todos os estudos (LI; MAGGADOTTIR; HAKONARSON, 2016).

Outro aspecto importante é que a herança genética pode ser diversificada em função das etnias, assim, as frequências dos polimorfismos podem variar entre populações, o que pode dificultar comparações de resultados. A seleção do grupo comparativo também pode causar um impacto nos resultados, e esse aspecto também não é uniforme na maioria dos estudos (NOVANOVIĆ et al., 2010). Além disso, as alergias alimentares são altamente submetidas a impactos ambientais que precisam ser considerados (LI; MAGGADOTTIR; HAKONARSON, 2016).

## **5.2 Características das crianças com APLV**

Ao se avaliar as características das crianças com APLV, mostradas na tabela 6, observa-se que aquelas com fenótipo gastrointestinal apresentaram duração significativamente menor do aleitamento materno exclusivo. Essa diferença pode estar diretamente relacionada ao período de introdução de fórmula infantil a base de leite de vaca na alimentação dos lactentes. Foi observado que a introdução de fórmula infantil ocorreu antes de 30 dias de vida em elevada parcela das crianças desse grupo, em comparação às crianças com fenótipo cutâneo/respiratório/anafilaxia, embora não tenha sido detectada diferença significativa. Contudo, a introdução de fórmula infantil precocemente no intestino imaturo pode explicar a menor duração do aleitamento materno exclusivo no grupo gastrointestinal e pode ter contribuído para o aparecimento da intolerância ao leite de vaca em período precoce nesse grupo.

Foi mostrado também que a idade no início da manifestação de sintomas atribuídos a APLV diferiu entre os grupos de fenótipos clínicos. As crianças com fenótipo gastrointestinal apresentaram os primeiros sintomas com mediana de 30 dias de vida, enquanto que aquelas com fenótipo cutâneo/respiratório/anafilaxia manifestaram sintomas em um período mediano de 90 dias (três meses).

Segundo Berg (2013), a exposição à alérgenos na vida pós-natal precoce de um lactente com uma predisposição genética para a alergia, pode ser considerado como um fator de risco essencial para o desenvolvimento posterior de doenças alérgicas. E os alérgenos mais importantes no início da vida derivam da nutrição precoce do bebê, por exemplo, a exposição às proteínas do leite de vaca. Essa exposição precoce, associada à ausência de fatores imunomoduladores presentes no leite materno, como a citocina TGF- $\beta$ , que promove o desenvolvimento de células T regulatórias, poderia conduzir a falha da tolerância oral (PALMER; PRESCOTT, 2012; JENNINGS; PRESCOTT, 2010).

Caldeira; Cunha e Ferreira (2011) também identificaram diferença significativa no período de início dos sintomas de acordo com o mecanismo de reação imune envolvido na APLV. As crianças com APLV mediada e não mediada por IgE manifestaram sintomas com mediana de dez e seis semanas de vida, respectivamente.

Em uma revisão da literatura, Host (2002) relatou que a maioria das crianças com APLV desenvolvem sintomas antes de um mês de vida, muitas vezes dentro de uma semana após a introdução da fórmula infantil à base de leite de vaca. No entanto, esses achados provavelmente se referem às manifestações de sintomas resultantes de uma imaturidade/intolerância gastrointestinal, enquanto os pesquisadores atuais relatam início dos sintomas próximo aos três meses de idade, sendo avaliadas em maioria crianças com reações mediadas por IgE (SOMMANUS et al., 2014; DIAS; SANTOS; PINHEIRO, 2010; MARTORELL et al., 2008).

Na presente pesquisa, em 41,4% das crianças com APLV foi verificada ausência de sintomas posteriormente a exposição às proteínas do leite de vaca em TPO ou através do consumo dessas proteínas na alimentação doméstica. Sendo observado que as crianças com manifestações predominantemente gastrointestinais apresentaram ausência de sintomas mais cedo, em comparação às crianças com reações cutâneas/respiratórias/anafilaxia.

Segundo Nicolau; Tsabouri e Priftis (2014), o mecanismo imune envolvido na APLV também pode influenciar no período de resolução dos sintomas. Essa afirmação é embasada nos resultados dos estudos que avaliaram a história natural da APLV, sendo mostrada uma tendência para a recuperação do quadro alérgico de forma precoce nas crianças com reações não mediadas por IgE (HOST; HALKEN, 2014; SAMPAIO et al., 2005).

Em recente estudo publicado a partir do *Euro Prevall birth cohort*, das 55 crianças diagnosticadas com APLV, 32 foram reavaliadas um ano após o início do acompanhamento. Destas, 22 (68,8%) não apresentaram mais sintomas. Observou-se que 100% das crianças com APLV não mediada por IgE e apenas 13 (56,5%) das 23 reavaliadas com reações mediadas por IgE se tornaram tolerantes às proteínas do leite de vaca (SCHOEMAKER et al., 2015). Similarmente, Vanto et al. (2004), acompanharam 162 crianças com APLV na Finlândia (95 com reações imediatas e 67 com reações tardias), e observou-se que as crianças com reações tardias desenvolveram tolerância mais cedo, em comparação as crianças com reações imediatas, quando avaliadas aos dois, três e quatro anos (64%, 92% e 96% vs 31%, 53% e 63%, respectivamente).

Esses achados mostram que os nossos resultados são compatíveis com os previamente relatados na literatura. É importante considerar também que, com base na história natural observada neste estudo e em estudos prévios, observa-se que as crianças com manifestações predominantemente gastrointestinais (reações não mediadas por IgE) apresentam um quadro alérgico transitório, com maturação imunológica geralmente nos primeiros dois anos de vida.

Essas características sugerem que possivelmente esse grupo de crianças possui intolerância às proteínas do leite de vaca (IPLV). Em contraste, as crianças que manifestam reações mediadas por IgE, com sintomas de maior intensidade e gravidade apresentam uma condição alérgica com maior tendência à persistência, e nesses casos possivelmente possuem o quadro clínico real de APLV.

### **5.3 Fatores associados a APLV e seus fenótipos clínicos**

Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas abordando os aspectos genéticos e ambientais, de forma isolada ou combinada, visando aumentar o entendimento sobre os fatores que poderiam causar um impacto maior na gênese das alergias alimentares, no entanto, muito ainda precisa ser esclarecido.

Na presente pesquisa, foram criados modelos explicativos simplificados dos possíveis fatores preditores para o desenvolvimento da APLV e dos dois fenótipos clínicos, comparando-os ao grupo sem APLV. Foi observado que a história de atopia na família, particularmente na mãe, o tipo de parto, especialmente a cesariana, a menor duração do aleitamento materno exclusivo e a prematuridade foram associados à APLV e/ou a um dos fenótipos clínicos. Vale salientar que foram incluídos alguns polimorfismos genéticos e variáveis ambientais, mas só permaneceram no modelo final as variáveis que apresentaram significância estatística. Contudo, é importante destacar que os modelos explicativos podem não ser representativos dos reais fatores envolvidos na gênese da APLV, tendo em vista a diversidade de fatores que podem estar implicados e não foram contemplados neste estudo.

Na presente pesquisa, a atopia materna auto-referida apresentou diferença significativa entre os casos e o grupo comparativo, sendo associada a uma chance 2,5 vezes maior para desenvolver APLV. A atopia paterna não foi associada à APLV na amostra estudada.

Em estudo realizado com 180 crianças polonesas com APLV, identificou-se que 91,1% dos familiares apresentavam algum tipo de alergia, sendo associada ao desenvolvimento da APLV (KOROL; KACZMARSKI, 2001). Em pesquisa recente conduzida por Doğruel et al. (2016), com 1.377 crianças acompanhadas do nascimento até um ano de idade na Turquia. Destas, 33 casos (2,4%) foram diagnosticadas com alergia alimentar,

sendo a APLV a mais prevalente, e demonstrou-se que a história familiar de atopia foi o principal fator de risco para alergia alimentar.

A história familiar é reconhecida como uma medida indireta do risco hereditário para o desenvolvimento de doenças alérgicas. No caso das alergias alimentares, há evidências de que a herança familiar tenha um papel na gênese dessas doenças, principalmente quando são levados em consideração os estudos realizados com famílias, mostrando que a sensibilização/alergia alimentar é mais comum em pessoas que possuem um parente de primeiro grau com alergia (TSAI et al., 2009).

Em um estudo de base populacional, observou-se que a história positiva de atopia em apenas um membro da família causou um aumento modesto (OR: 1,4; IC95%: 1,1 -1,7), enquanto que a existência de dois ou mais membros da família alérgicos causaram um impacto maior no risco (OR: 1,8; IC95%: 1,5-2,3) para alergia alimentar. Com base nos seus resultados, os autores sugerem que o conceito de “alto risco” para alergia alimentar deveria ser empregado nos casos das crianças que possuem dois ou mais membros da família alérgicos (KOPLIN et al., 2013). Contudo, no estudo em questão foram avaliadas crianças com alergia a ovo, amendoim e gergelim.

Segundo Oyoshi et al. (2014), a alergia materna é um fator de risco para doença alérgica na criança. Os mecanismos pelos quais a herança de atopia materna causa um impacto maior no risco de doenças alérgicas na criança ainda são mal compreendidos. No entanto, é relatado que os estímulos para o desenvolvimento da atopia iniciam durante o período gestacional, onde o ambiente materno influencia o sistema imunológico do feto (PRESCOTT, 2010). Assim, a combinação da herança materna de atopia associada ao ambiente estimulante pode contribuir para o desenvolvimento da alergia alimentar na infância.

Por outro lado, Goldberg et al. (2013), avaliando 66 crianças com APLV IgE mediada e 156 controles selecionados a partir de um estudo de base populacional não encontraram diferenças significantes no auto-relato dos pais em relação ao estado atópico entre as crianças com APLV e o grupo controle. No entanto, no subgrupo de crianças com APLV persistente, a atopia materna, mas não a atopia paterna apresentou maior frequência, quando comparados ao grupo controle.

É amplamente aceito na literatura que os fatores ambientais conferem forte influencia sobre a programação imunológica no início da vida, e dentre esses o tipo de parto têm sido



destacado. Estudos de revisão sistemática e meta-análise relatam que o tipo de parto pode ser parcialmente responsável pelo aumento das sensibilização/alergias alimentares e outras doenças alérgicas na infância como rinite alérgica e asma (MARRS et al., 2013; KOPLIN et al., 2008; BAGER; WOHLFAHRT; WESTERGAARD, 2008).

Na presente pesquisa, o nascimento através de cesariana foi significativamente associado com a APLV (OR: 2,68) e ao aumento da chance para o fenótipo clínico de reações possivelmente mediadas por IgE (OR: 3,5), como mostrado nas tabelas 7 e 9.

O parto cesário tem sido apontado como um dos fatores relacionados com aumento de doenças alérgicas na infância, por favorecer a disbiose intestinal. Segundo Di Costanzo; Amoroso e Canani (2016), a maturação de uma flora intestinal saudável no início da vida permite um equilíbrio na população de células Th1/Th2, favorecendo as respostas do tipo Th1, enquanto a disbiose altera a homeostase entre o hospedeiro-microbiota, o que acarreta em mudança no padrão da resposta imune para um perfil Th2. Sendo assim, poderia explicar a associação encontrada em nosso estudo entre a cesariana e o aumento do risco para o fenótipo cutâneo/respiratório/anafilaxia.

Os bebês nascidos por meio de cesariana têm colonização menos frequente com lactobacilos e apresentam menor quantidade de *Bifidobacterium* e espécies de *Bacteroides*. Em contrapartida, eles são mais frequentemente colonizados por *Clostridium difficile*. Estas alterações da flora intestinal são aparentes na primeira semana de vida precedendo sintomas clínicos, sugerindo assim um papel em doenças alérgicas. Além disso, a cesariana está associada com o aumento de IL-13 e INF- $\gamma$  em neonatos, o que pode contribuir para o desenvolvimento de atopia (TSABOURI et al., 2014).

Por outro lado, durante o parto transvaginal a criança é exposta às bactérias vaginais e fecais da mãe como a *Streptococcus B.*, *Escherichia coli* e *Lysteria monocytogenes*, que atuam de forma benéfica, estimulando a maturação do sistema imune local, protegendo as crianças de quadros alérgicos (CONROY; SHI; WALKER, 2009).

Outros estudos abordando sensibilização/alergias alimentares também encontraram forte associação com o tipo de parto. Eggesbo et al. (2005) relataram que a APLV foi duas vezes mais frequente em crianças que nasceram através do parto cesáreo, em comparação àquelas que nasceram através do parto transvaginal, principalmente as crianças nascidas de mães alérgicas.

Achados similares foram encontrados em estudo seccional aninhado a uma coorte de nascimento espanhol, que encontrou maior risco de APLV mediada por IgE em crianças nascidas através da cesariana, quando comparadas a crianças com manifestações de APLV não mediadas por IgE (OR: 2,14; IC95%: 1,02 – 4,49). Foi sugerido que o parto cesáreo cause um atraso na colonização intestinal da criança, que pode durar ao longo dos primeiros meses de vida e a ausência de colonização por Bifidobactérias pode favorecer a resposta imunológica do tipo Th2 que confere as reações mediadas por IgE (SÁNCHEZ-VALVERDE et al., 2009).

Em estudo prospectivo recente, que acompanhou 459 crianças até 36 meses de idade, identificou-se que as crianças com pelo menos um dos pais alérgico e nascidos por cesariana apresentaram maior probabilidade de desenvolver alergia alimentar, quando comparadas as crianças nascidas através de parto transvaginal com pais não-alérgicos (PAPATHOMA et al., 2016).

Ao contrário da cesariana, o parto transvaginal foi associado com redução de atopias na infância, principalmente o domiciliar, reduzindo o risco de dermatite atópica, sensibilização a alérgenos alimentares e asma (NIMWEGEN et al., 2011),

Por outro lado, em estudo retrospectivo finlandês, que avaliou 3.181 crianças com idades entre um e quatro anos, não foi encontrada associação significativa entre o tipo de parto e alergias alimentares (PYHHÖNEN et al., 2013).

Além do tipo de parto, outro fator ambiental que tem merecido destaque é o aleitamento materno. É reconhecido que o colostro e o leite humano fornecem vários nutrientes e componentes da imunidade humoral e celular, necessários para o crescimento e desenvolvimento normal do recém-nascido. Fornece também um adequado microambiente para a maturação morfológica, microbiológica e imunológica do intestino nos primeiros dias de vida. Dessa forma, pode desempenhar um papel importante na prevenção de alergias (MINNITI et al., 2014).

De acordo com Brandizaeg (2010), o efeito protetor da amamentação pode ser atribuído a fatores como a diminuição da exposição a antígenos exógenos como os antígenos alimentares, proteção contra infecções, tendo em vista que o leite materno transfere imunidade da mãe para a criança, além de favorecer o desenvolvimento de flora bacteriana intestinal benéfica que atuaria modulando a resposta imune.

Em nossa população, o período de aleitamento materno exclusivo foi pequeno em quase 60% dos casos de APLV. O grupo com fenótipo gastrointestinal foi o que apresentou maior percentual de crianças com menor duração do aleitamento materno. Na análise multivariada, essa variável foi considerada como contribuinte para a criança desenvolver APLV, embora tenha se apresentado no limiar de significância estatística. No entanto, foi associada significativamente para o desenvolvimento da APLV com fenótipo clínico gastrointestinal, como mostrado nas tabelas 7 e 8.

Os resultados de estudos prévios se mostram conflitantes em relação ao efeito protetor do aleitamento materno na prevenção de alergias na infância. Em uma revisão da literatura, Odiijk et al. (2003) analisaram artigos publicados entre 1966-2001 sobre a amamentação e sua relação com alergias, e concluíram que a amamentação parece proteger contra o desenvolvimento dessas doenças, principalmente nos casos de crianças com maior risco de atopia estimada pela presença de atopia familiar. Em contraste, em uma revisão sistemática e meta-análise recente, não foi encontrada associação entre aleitamento materno e alergia alimentar. A conclusão foi atribuída à elevada heterogeneidade e baixa qualidade dos estudos analisados (LODGE et al., 2015).

Em estudo prospectivo realizado com 335 crianças, foi avaliada a duração do aleitamento materno exclusivo no desenvolvimento de sensibilização para 12 inalantes comuns e 10 alérgenos alimentares. Os pesquisadores não encontraram associação entre a duração do aleitamento materno exclusivo e sensibilização nos primeiros seis meses, 18 meses, quatro e seis anos (JELDING-DANNEMAND; SCHOOS; BISGAARD, 2015).

No entanto, em um estudo de coorte com 258 crianças taiwanesas comparou-se aquelas que foram alimentadas exclusivamente com leite materno por período igual ou superior a quatro meses, aquelas com período inferior a quatro meses e aquelas parcialmente amamentadas, mostrando-se que a amamentação exclusiva por mais tempo diminuiu o risco de sensibilização às proteínas do leite de vaca em menores de dois anos. Sendo sugerido que a amamentação exclusiva por quatro meses ou mais poderia retardar ou reduzir a exposição às proteínas do leite de vaca e, com isso, resultar em menor sensibilização (LIAO et al., 2014). De forma similar, encontrou-se efeito protetor do aleitamento materno exclusivo por quatro meses ou mais contra asma e sensibilização, em comparação às crianças amamentadas por período inferior a quatro meses (KULL et al., 2010).

Katz et al. (2010), em um estudo prospectivo, com 13.019 crianças israelitas detectaram que aquelas que receberam fórmula infantil complementar ao aleitamento materno

nos primeiros 15 dias de vida apresentaram um menor risco para APLV mediada por IgE, em comparação às crianças que receberam suplementação depois dos 15 dias, sendo sugerido que a exposição precoce a elevada quantidade de proteínas do leite de vaca promoveu tolerância oral nessa população.

Friedman e Zeiger (2005) afirmam que os alérgenos presentes do leite materno podem em muitos casos causar sensibilização e em outros casos possuírem efeito protetor, dependendo de uma variedade de fatores como a predisposição genética da criança, e a composição do leite materno, podendo variar de acordo com a alimentação materna, o que pode contribuir para os resultados conflitantes das pesquisas abordando aleitamento materno e a suscetibilidade para alergias.

A Academia Americana de Pediatria (AAP), avaliando achados de estudos sobre amamentação e prevenção de doenças alérgicas na infância relata que em recém-nascidos de alto risco, a amamentação exclusiva por, pelo menos, quatro meses previne ou retarda a dermatite atópica, APLV e sibilância no início da vida (THYGARAJAN; BURKS, 2008). No entanto, a ESPGHAN recomenda que o aleitamento materno exclusivo deve ser continuado até os seis meses de vida para crianças com história familiar de alergia (AGOSTONI et al., 2009). É amplamente aceito que o aleitamento materno é a forma ideal de nutrir a criança, com inúmeros benefícios para o lactente e para a mãe (FRIEDMAN; ZEIGER, 2005). Contudo, não existe um consenso no período de duração ideal e no efeito protetor contra as doenças alérgicas na infância.

A imaturidade da barreira mucosa intestinal vem sendo apontada como um dos mecanismos que poderia explicar a elevada incidência de alergias alimentares em lactentes e crianças (FERREIRA; SEIDMAN, 2007). Segundo Corpeleijn et al. (2011), as crianças que nascem prematuramente apresentam um aumento da permeabilidade intestinal, em comparação aos recém-nascidos a termo. A quantidade de proteínas intactas absorvidas pode ser 100 vezes maior, quando comparada ao recém-nascido a termo. Esse fenômeno pode elevar a chance de desenvolver alergias alimentares, principalmente as reações mediadas por IgE (HONG; WANG, 2012). Contudo, esse distúrbio é inversamente proporcional à idade gestacional (WEAVER; LAKER; NELSON, 1984).

E neste sentido impõe-se avaliar a prematuridade no presente estudo, e observou-se que o nascimento prematuro foi mais frequente no grupo de lactentes com APLV, principalmente entre aqueles que apresentavam fenótipo clínico cutâneo/respiratório/anafilaxia, embora não tenha sido detectada significância estatística.

Contudo, a prematuridade foi associada a uma chance 3,19 vezes maior para a criança manifestar esse fenótipo clínico, como apresentado na tabela 9.

Dados obtidos em estudo populacional mostram que os prematuros de muito baixo peso ao nascer (500g-1500g) apresentam uma probabilidade maior de alergia alimentar, quando comparados aos nascidos com peso adequado (3000g-3500g) (CHANDRAN et al., 2013). Em estudo conduzido com 61 recém-nascidos prematuros observou-se que o uso de fórmula infantil a base de leite de vaca causou sensibilização alimentar, em comparação aos alimentados com leite materno. A sensibilização foi maior nos prematuros com baixo peso ao nascer (LUCAS; MCLAUGHLAN, COOMBS, 1984).

No entanto, os resultados de outros estudos são contraditórios em relação ao efeito da prematuridade sobre a alergia alimentar. Em estudo de base populacional do Japão, o baixo peso ao nascer foi associado a um risco significativamente menor de alergia alimentar e dermatite atópica aos 18 meses de idade, assumindo-se que a imaturidade não causou um prejuízo ao ganho de tolerância oral (HIKINO et al., 2001).

Por outro lado, em estudo de base populacional canadense, incluindo 13.980 crianças, não foi encontrada associação entre o nascimento prematuro e o baixo peso ao nascer com alergia alimentar (LIEM et al., 2007). Estudo realizado com 24 neonatos com quadro sugestivo de APLV com manifestações predominantemente gastrintestinais, não observou diferença significativa entre os nascidos a termo e prematuros em relação ao desenvolvimento da alergia alimentar (MORITA et al., 2013).

Da mesma forma, em estudo realizado com 80 prematuros e 80 nascidos a termo, com idades entre nove e 24 meses, pareados por sexo e idade, avaliados por teste cutâneo de hipersensibilidade para oito alérgenos alimentares e seis alérgenos inalantes, não foi encontrada diferença significativa entre os prematuros e nascidos a termo em relação à sensibilização alimentar. Os autores sugerem que a permeabilidade intestinal aumentada não causou um efeito sobre a sensibilização alimentar no grupo estudado, tendo em vista que a tolerância oral pode ser alcançada com elevada concentração de antígenos no sistema imune mucoso dos prematuros (MARTINO et al., 1989).

Taylor et al. (2009) mostraram que o aleitamento materno causou uma redução significativa na permeabilidade intestinal em prematuros, quando comparados aos prematuros recebendo fórmula infantil, principalmente nos primeiros 14 dias de vida. O efeito da

prematuridade sobre a ocorrência de alergias alimentares em algumas condições pode ser suprimido, como naqueles em aleitamento materno exclusivo ou predominante.

## 6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os polimorfismos nos genes das citocinas tolerogênicas (TGF- $\beta$ 1 e IL-10), inflamatória (IL-4) e do gene VDR (Fok I e Taq I) não apresentaram associação estatística com a APLV e seus fenótipos clínicos. Contudo, a atopia materna, a menor duração do aleitamento materno exclusivo, a cesariana e a prematuridade apresentaram associação com a APLV e/ou as suas apresentações fenotípicas, sugerindo-se que os genótipos analisados não apresentaram um impacto importante e o ambiente pode exercer um efeito potencialmente maior sobre a patogênese dessa enfermidade.

Os resultados mostraram que as crianças com fenótipo gastrointestinal apresentaram menor duração do aleitamento materno exclusivo, início dos sintomas atribuídos à ingestão de leite de vaca em período precoce, porém com resolução dos sintomas mais cedo, em comparação às crianças com fenótipo clínico cutâneo/respiratório/anafilaxia, confirmando o caráter transitório desse fenótipo clínico, revelando também a heterogeneidade das apresentações fenotípicas da APLV.

É importante considerar que a amostra pequena e as perdas de genotipagem podem ter influenciado nos resultados encontrados, por diminuir a possibilidade de detectar as variabilidades genótípicas em um grupo maior de indivíduos. Deve ser destacado também que esses polimorfismos genéticos podem conferir maior impacto quando avaliados em âmbito populacional, enquanto que em estudos clínicos exploratórios como este, essas pequenas variabilidades genéticas podem não apresentar importância.

Compreendemos a necessidade de novos estudos de associação, relacionando os genes participantes da imunidade inata, das respostas com perfil Th1, Th2, Treg e outros genes envolvidos no metabolismo da vitamina D em crianças brasileiras com APLV para permitir maiores informações do componente genético no desenvolvimento dessa patologia, principalmente estudos de base populacional, com grandes amostras, tanto em Pernambuco como em outras regiões brasileiras. Assim, talvez seja detectada de forma mais segura a influência desses polimorfismos sobre as alergias alimentares em crianças brasileiras. Da mesma forma, são necessários mais estudos que relacionem os polimorfismos com a expressão dos genes, o que permitiria uma interpretação mais ampla das consequências funcionais das variações genéticas encontradas.

É possível que novos estudos de base populacional analisando os polimorfismos da região promotora do gene IL-10 em crianças com APLV consigam obter dados mais robustos sobre o seu efeito na quebra da tolerância oral e sobre a persistência do quadro alérgico. Da mesma forma, novas pesquisas populacionais que explorem os polimorfismos do gene do receptor de vitamina D, associados a sua expressão gênica, poderiam trazer novas evidências da possível influência dessas variações na atuação biológica da vitamina como a modulação imunológica para um perfil tolerogênico ou APLV.



## REFERÊNCIAS

ACEVEDO, N. et al. The C-509T Promoter Polymorphism of the Transforming Growth Factor Beta-1 Gene Is Associated with Levels of Total and Specific IgE in a Colombian Population. **International Archives of Allergy Immunology**, v. 151, n. 3, p. 237-246, Sept. 2010.

ADAMS, J. S.; HEWISON, M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Clinical Practice Endocrinology Metabolism**, v. 4, n. 2, p. 80-90, Feb. 2008.

AGOSTONI, C. et al. Breast-feeding: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 49, n. 1, p. 112-125, Jul. 2009.

AHRENS, B. et al. Individual cow's milk allergens as prognostic markers for tolerance development? **Clinical & Experimental Allergy**, v. 42, n. 11, p. 1630-1637, Nov. 2012.

ALAM, R. et al. Transforming growth factor beta abrogates the effects of hematopoietins on eosinophils and induces their apoptosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 3, p. 1041-1045, Mar.1994.

ALLEN, K. J. et al. Vitamin D insufficiency is associated with challenge-proven food allergy in infants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 4, p. 1109-1116, Apr. 2013.

ALLEN, K. J.; MARTIN, P. E. Clinical aspects of pediatric food allergy and failed oral immune tolerance. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 44, n. 6, p. 391-401, Jul. 2010.

BAEKE, F. et al. Vitamin D: modulator of the immune system. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 482-496, Aug. 2010.

\_\_\_\_\_. Vitamin D3 and the immune system: maintaining the balance in health and disease. **Nutrition Research Reviews**, v. 20, n. 1, p. 106-118, June. 2007.

BAGER, P.; WOHLFAHRT, J.; WESTERGAARD, T. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 4, p. 634-642, Apr. 2008.

BALASUBRAMANIAN, S. P. et al. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 30, n. 6, p. 593-601, Aug. 2004.

BENHAMOU, A. H. An overview of cow's milk allergy in children. **Swiss Medical Weekly**, v. 139, n. 21-22, p. 300-307, May. 2009.

BERG, A. von. et al. Allergies in high-risk schoolchildren after early intervention with cow's milk protein hydrolysates: 10-year results from the German Infant Nutritional Intervention

(GINI) study. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 6, p. 1565-1573, June. 2013.

BERIN, C. M. Immunopathophysiology of food protein-induced enterocolitis syndrome. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 5, p. 1108-1113, May 2015.

BERIN, M. C.; SHREFFLER, W. G. Mechanisms Underlying Induction of Tolerance to Foods. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 87-102, Feb. 2016.

BIKLE, D. Nonclassic Actions of Vitamin D. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 1, p. 26-34, Jan. 2009.

BISHOP, J. M.; HILL, D. J.; HOSKING, C. S. Natural history of cow milk allergy: clinical outcome. **Journal of Pediatrics**, v. 116, n. 6, p. 862-867, June. 1990.

BJÖRKSTÉN, B. Genetic and environmental risk factors for the development of food allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 5, n. 3, p. 249-253, June. 2005.

BOCŞAN, J. C.; MUNTEAN, A.; BUZOIANU, A. D. The association between the interleukin-10 gene polymorphism (-1082 G/A) and allergic diseases. **Human & Veterinary Medicine**, v. 7, n. 4, p. 237-243, 2015.

BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, sup. 2, p. S33-S40, Feb. 2010.

BOONSTRA, A. et al. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 Has a Direct Effect on Naive CD4<sup>+</sup>T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 9, p. 4974-4980, 2001.

BOYCE, J. A. 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**, v. 126, n. 6, p. 1105-1118, Dec. 2010.

BRANDZAEG, P. Food allergy: separating the Science from the mythology. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, n. 7, p. 380-400, Jul. 2010.

BROWN, P. et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in key cytokines may modulate food allergy phenotypes. **European Food Research and Technology**, v. 235, n. 5, p. 971-980, Nov. 2012.

BUČKOVA, D. et al. TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms. **Allergy**, v. 56, n. 12, p. 1236-1237, Dec. 2001.

BURKS, A. W.; LAUBACH, S.; JONES, S. M. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 6, p. 1344-1350, June. 2008.

CALDEIRA, F.; CUNHA, J.; FERREIRA, M. G. Alergia a proteínas de leite de vaca um desafio diagnóstico. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, n. 4, p. 505-510, 2011.

- CAMPOS ALBERTO, E. et al. IL-10 gene polymorphism, but not TGF-1 gene polymorphisms, is associated with food allergy in a Japanese population. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 19, n. 8, p. 716-721, 2008.
- CANANI, B. R.; GILBERT, J. A.; NAGLER, C. R. The role of the commensal microbiota in the regulation of tolerance to dietary allergens. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 15, n. 3, p. 243-249, June. 2015.
- CANANI, R. B. et al. Differences in DNA methylation profile of Th1 and Th2 cytokine genes are associated with tolerance acquisition in children with IgE-mediated cow's milk allergy. **Clinical Epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 38, Mar. 2015.
- CANTANI, A.; MICERA, M. Natural history of cow's milk allergy. An eight-year follow-up study in 115 atopic children. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 8, n. 4, p. 153-164, July./Aug. 2004.
- CANTORNA, M. T. et al. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1717S-1720S, 2004. Suplemento 1.
- CAO, S.; FEEHLEY, T. J.; NAGLER, C. R. The role of commensal bacteria in the regulation of sensitization to food allergens. **Febs Letters**, v. 588, n. 22, p. 4258-4266, 2014.
- CASOLARO, V. et al. Biology and genetics of atopic disease. **Current Opinion in immunology**, v. 8, n. 6, p. 796-803, 1996.
- CHAHINE, B. G.; BAHNA, S. L. The role of the gut mucosal immunity in the development of tolerance versus development of allergy to food. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 10, n. 4, p. 394-399, Aug. 2010.
- CHAMBERS, E. S.; HAWRYLOWICZ, C. M. The impact of vitamin D on regulatory T cells. **Current Allergy Asthma Reports**, v. 11, n. 1, p. 29-36, Feb. 2011.
- CHANDRAN, U. et al. Food Allergy Among Low Birthweight Children in a National Survey. **Maternal and Child Health Journal**, v. 17, n. 1, p. 165-171, Jan. 2013.
- CHATTERJEE, R. et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and atopic asthma in North Indians. **Clinical Experimental Allergy**, v. 35, n. 7, p. 914-919, Jul. 2005.
- CHEHADE, M.; MAYER, L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 1, p. 3-12, Jan. 2005.
- CHEN, T. K. et al., Association between human IL-10 gene polymorphisms and serum IL-10 level in patients with food allergy. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 111, n. 12, p. 686-692, Dec. 2012.
- CHI, A. et al. Umbilical cord plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and immune function at birth: the Urban Environment and Childhood Asthma (URECA) study. **Clinical Experimental Allergy**, v. 41, n. 6, p. 842-850, June. 2011.
- CHINTHRAJAH, R. S. et al. Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 4, p. 984-997, Apr. 2016.

CHO, M. J.; ELLEBRECHT, C. T.; PAYNE, A. S. The dual nature of interleukin-10 in pemphigus vulgaris. **Cytokine**, v. 73, n. 2, p. 335-341, June. 2015.

CLARK, R.; KUPPER, T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, n. 4, p. 629-637, Oct. 2005.

COCHRANE, S. et al. Factors influencing the incidence and prevalence of food allergy. **Allergy**, v. 64, n. 9, p. 1246-1255, Sept. 2009.

COMMINS, S. P. Mechanisms of Oral Tolerance. **Pediatrics Clinics of North America**, v. 62, n. 6, p. 1523-1529, 2015.

COMMINS, S.; STEINKE, J. W.; BORISH, L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 5, p. 1108-1111, May. 2008.

CONROY, M. E.; SHI, H. N.; WALKER, W. A. The long-term health effects of neonatal microbial flora. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 9, n. 3, p. 197–201, June. 2009.

CORPELEIJN, W. E. et al. Assessment of intestinal permeability in (premature) neonates by sugar absorption tests. **Methods in Molecular Biology**, v. 763, p. 95-104, 2011.

CORREA, F. F. et al. Open challenge for the diagnosis of cow's milk protein allergy. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 2, p. 163-166, Mar./Apr. 2010.

CRAWLEY, E. et al. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 42, n. 6, p. 1101-1108, June. 1999.

CRITTENDEN, R. G.; BENNETT, L. E. Cow's milk allergy: a complex disorder. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 24, p. 582S-591S, Dec. 2005. Suplemento 6.

DE GREEF, E. et al. Diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. **World Journal of Pediatrics**, v. 8, n. 1, p. 19-24, Feb. 2012.

DELLA GIUSTINA, A. et al. Vitamin D, allergies and asthma: focus on pediatric patients. **The World Allergy Organization Journal**, v. 10, n. 7, p. 27, Dec. 2014.

DELUCA, H. F. Is there more to learn about functional vitamin D metabolism? **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 148, p. 3-6, Apr. 2015.

DI COSTANZO, M.; AMOROSO, A.; CANANI, R. B. Gut Microbiota as a Target for Food Allergy. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 63, p. S11-13, Jul. 2016. Suplemento 1.

DIAS, A.; SANTOS, A.; PINHEIRO, J. A. Persistence of cow's milk allergy beyond two years of age. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 38, n. 1, p. 8–12, Jan./Feb. 2010.

DIMELOE, S. et al. Regulatory T cells, inflammation and the allergic response-The role of glucocorticoids and Vitamin D. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 120, n. 2-3, p. 86-95, May. 2010.

DOĞRUEL, D. et al. Clinical Features of Food Allergy during the 1st Year of Life: The ADAPAR Birth Cohort Study. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 169, n. 3, p. 171-180, 2016.

DU TOIT, G. et al. Identifying and managing cow's milk protein allergy. **Archives of Disease and Childhood Education and Practice Edition**, v. 95, n. 5, p. 134-144, Oct. 2010.

EGGESBØ, M. et al. Cesarean delivery and cow milk allergy/intolerance. **Allergy**, v. 60, n. 9, p.1172-1173, Sep. 2005.

EINISMAN, H. et al. Vitamin D levels and vitamin D receptor gene polymorphisms in asthmatic children: a case-control study. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 26, n. 6, p. 545-550, Sep. 2015.

ELIZUR, A. et al. Cow's milk associated rectal bleeding: a population based prospective study. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 23, n. 8, p. 766-770, Dec. 2012.

ESKDALE, J. et al. Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. **Genes and Immunity**, v. 1, n. 2, p. 151-155, Nov. 1999.

ETTEN, E. V. et al. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: Functional impact on the immune system. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 2, p. 395-405, Feb. 2007.

FAGUNDES-NETO, U.; GANC, A. J. Proctocolite alérgica: a evolução clínica de uma enfermidade de caráter transitório e de tendência familiar. Relato de casos. **Einstein**, v.11, n. 2, p.229-233, 2013.

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunological Reviews**, v. 206, p. 232-59, Aug. 2005.

FARIA, I. C. J. et al. Association of TGF- $\beta$ 1, CD14, IL-4, IL-4R and ADAM33 gene polymorphisms with asthma severity in children and adolescents. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 3, p. 203-210, May./Jun. 2008.

FERREIRA, C. T.; SEIDMAN, E. Food allergy: a practical update from the gastroenterological viewpoint. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 1, p. 7-20, Jan./Feb. 2007.

FERREIRA, S. et al. Alergia às proteínas do leite de vaca com manifestações gastrointestinais. **Nascer e Crescer**, v. 23, n. 2, p. 72-79, 2014.

FIOCCHI, A. et al. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 21, n. 21, p. 1-125, 2010.

FRIEDMAN, N. J; ZEIGER, R. S. The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 6, p. 1238-1248, Jun. 2005.

- GADDAM, S. L. et al. Association of Interleukin-10 Gene Promoter Polymorphism in Allergic Patients. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 16, n. 6, p. 632-635, Jun. 2012.
- GEHA, R. S. Regulation of IgE synthesis in humans. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 90, p. 143–50, 1992.
- GIBBONS, T. E. et al. Non-IgE-Mediated Cow Milk Allergy Is Linked to Early Childhood Clusters of Commonly Seen Illnesses: A Pilot Study. **Clinical Pediatrics**, v. 51, n. 4, p. 337-344, Apr. 2012.
- GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 635–638, Feb. 2007.
- GOLDBERG, M. et al. Role of parental atopy in cow's milk allergy: a population-based study. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 110, n. 4, p. 279-83, Apr. 2013.
- GROUX, H. et al. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4<sup>+</sup> T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 1, p. 19-29, Jul. 1996.
- HAN, J. C. et al. Vitamin D receptor polymorphisms may contribute to asthma risk. **The Journal of Asthma**, v. 53, n. 8, p. 790-800, Oct. 2016.
- HARRISON, O. J. ; POWRIE, F. M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance in the Intestine. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 7, p. 1-17, Sep. 2013.
- HAWRYLOWICZ, C. M. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 11, p. 1459-1463, Dec. 2005.
- HAYDEN, C. M. et al. Regulatory role of IL10 genetic variations in determining allergen-induced TH2 cytokine responses in children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 1, p. 237-239, Jul. 2011.
- HEINE, G. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 promotes IL-10 production in human B cells. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 8, p. 2210-2218, Aug. 2008.
- HEINZMANN, A. et al. Polymorphisms of the TGF-beta1 gene are not associated with bronchial asthma in Caucasian children. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 16, n. 4, p. 310-314, Jun. 2005.
- HEWISON, M. An update on vitamin D and human immunity. **Clinical Endocrinology**, v. 76, n. 3, p. 315-325, Mar. 2012.
- HIKINO, S. et al. Food allergy and atopic dermatitis in low birthweight infants during early childhood. **Acta Paediatrica**, v. 90, n. 8, p. 850-855, Aug. 2001.
- HOBBS, K. et al. Interleukin-10 and Transforming Growth Factorb Promoter Polymorphisms in Allergies and Asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 158, n. 6, p. 1958–1962, Dec. 1998.
- HOLLOWAY, J. W. et al. Genetics of allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S81-S94, Feb. 2010. Suplemento 2.

HONG, X. et al. Gene polymorphisms, breast-feeding, and development of food sensitization in early childhood. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 2, p. 374-381, Aug. 2011.

HONG, X.; WANG, X. Early Life Precursors, Epigenetics, and the Development of Food Allergy. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 5, p. 655–669, Sep. 2012.

HONG, X.; WANG, X. Epigenetics and Development of Food Allergy (FA) in Early Childhood. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 14, n. 9, p. 460, Sep. 2014.

HØST, A. Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy. Some clinical, epidemiological and immunological aspects. **Pediatrics Allergy and Immunology**, v. 5, p. 1-36, 1994. Suplemento 5.

HØST, A. et al. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 13, p. 23–28, 2002. Suplemento 15.

HØST, A; HALKEN, S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. **Allergy**, v. 45, n. 8, p. 587-596, Nov. 1990.

HØST, A; HALKEN, S. Cow's Milk Allergy: Where have we Come from and where are we Going? **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 14, n. 1, p. 2-8, Mar. 2014.

HRDÝ, J. et al. Cytokine expression in the colostral cells of healthy and allergic mothers. **Folia Microbiologica**, v. 57, n. 3, p. 215-219, May. 2012.

HUANG, F.; KIM, J. S. IgE-Mediated Cow's Milk Allergy in Children. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 12, n. 6, p. 630-640, Dec. 2012.

HUANG, H. R.; ZHONG, Y. Q.; WU, J. F. The association between IFN- $\gamma$  and IL-4 genetic polymorphisms and childhood susceptibility to bronchial asthma. **Gene**, v. 494, n. 1, p. 96–101, Feb. 2012.

HYPPÖNEN, E. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and IgE – a significant but nonlinear relationship. **Allergy**, v. 64, n. 4, p. 613-620, Apr. 2009.

JACOB, C. M. et al. Interleukin 10 (IL10) and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) gene polymorphisms in persistent IgE-mediated cow's milk allergy. **Clinics**, v. 68, n. 7, p. 1004-1009, Jul. 2013.

JANEWAY JR, C. A. et al. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5. ed. New York: Garland Science, 2001.

JÄRVINEN, K. M. et al. Does Low IgA in Human Milk Predispose the Infant to Development of Cow's Milk Allergy? **Pediatric Research**, v. 48, n. 4, p. 457-462, 2000.

JÄRVINEN, K. M.; SUOMALAINEN, H. Development of cow's milk allergy in breast-fed infants. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 31, n. 7, p. 978-987, Jul. 2001.

JELDING-DANNEMAND, E.; SCHOOS, A-M. M.; BISGAARD, H. Breast-feeding does not protect against allergic sensitization in early childhood and allergy-associated disease at age 7 years. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 5, p. 1302-1308, Nov. 2015.

JENNINGS, S.; PRESCOTT, S. L. Early dietary exposures and feeding practices: role in pathogenesis and prevention of allergic disease? **Postgraduate Medical Journal**, v. 86, p. 94-99, 2010.

JO, J. et al. Role of Cellular Immunity in Cow's Milk Allergy: Pathogenesis, Tolerance Induction, and Beyond. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1-10, Jun. 2014.

KACZMARSKI, M. et al. The natural history of cow's milk allergy in north-eastern Poland. **Advances in Medical Sciences**, v. 58, n. 1, p. 22-30, 2013.

KAMEN, D. L.; TANGPRICHA, V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. **Journal of Molecular Medicine**, v. 88, n. 5, p. 441-450, May. 2010.

KARIMABAD, M. N. et al. Is the IL-10 promoter polymorphism at position -592 associated with immune system-related diseases? **Inflammation**, v. 36, n. 1, p. 35-41, 2013.

KARLSSON, M. R.; RUGTVEIT, J.; BRANDTZAEG, P. Allergen-responsive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Children who Have Outgrown Cow's Milk Allergy. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 12, p. 1679–1688, Jun. 2004.

KATTAN, J. D.; COCCO, R. R.; JÄRVINEN, K. M. Milk and soy allergy. **Pediatric Clinics of North America**, v.58, n. 2, p. 407-426, Apr. 2011.

KATZ, Y. et al. Early exposure to cow's milk protein is protective against IgE-mediated cow's milk protein allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 1, p. 77-82, Jul. 2010.

KAYSEROVA, J. et al. A Prospective Study in Children With a Severe Form of Atopic Dermatitis: Clinical Outcome in Relation to Cytokine Gene Polymorphisms. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v. 22, n. 2, p. 92-101, 2012.

KILIÇ, S. et al. Vitamin D Receptor Gene BSML, FOKI, APAI, and TAQI Polymorphisms and the Risk of Atopic Dermatitis. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v. 26, n. 2, p. 106-110, 2016.

KINGO, K. et al. IL-10 promoter polymorphisms influence disease severity and course in psoriasis. **Genes and Immunity**, v. 4, n. 6, p. 455-457, Sep. 2003.

KITANAKA, S. et al. Association of vitamin D-related gene polymorphisms with manifestation of vitamin D deficiency in children. **Endocrine Journal**, v. 59, n. 11, p. 1007-1014, 2012.

KOLETZKO, S. et al., Diagnostic Approach and Management of Cow's-Milk Protein Allergy in Infants and Children: ESPGHAN GI Committee Practical Guidelines. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 55, n. 2, p. 221–229, Aug. 2012.



KOPLIN, J. J. et al. Is caesarean delivery associated with sensitization to food allergens and IgE-mediated food allergy? A systematic review. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 19, n. 8, p. 682-687, Dec. 2008.

KOPLIN, J. J. et al. The Impact of Family History of Allergy on Risk of Food Allergy: A Population-Based Study of Infants. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 11, p. 5364-5377, 2013.

KOPLIN, J. J.; MILLS, E. N. C.; ALLEN, K. J. Epidemiology of food allergy and food-induced anaphylaxis: is there really a Western world epidemic? **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 15, n. 5, p. 409–416, Oct. 2015.

KOROL, D.; KACZMARSKI, M. Positive family history of allergy in children with hypersensitivity to cow's milk. **Medical Science Monitor**, v. 7, n. 5, p. 966-970, Sep. 2001.

KULL, I. et al. Breast-feeding in relation to asthma, lung function, and sensitization in young schoolchildren. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 5, p. 1013-1019, May. 2010.

LEE, S. E.; KIM, H. Update on Early Nutrition and Food Allergy in Children. **Yonsei Medical Journal**, v. 57, n. 3, p. 542-548, May. 2016.

LESIAK, A. et al. Atopic dermatitis patients carrying G allele in –1082 G/A IL-10 polymorphism are predisposed to higher serum concentration of IL-10. **Archives of Medical Science**, v. 10, n. 6, p.1239-1243, Dec. 2014.

LI, J.; MAGGADOTTIR, S. M.; HAKONARSON, H. Are genetic tests informative in predicting food allergy? **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 16, n.3, p. 257-264, Jun. 2016.

LIAO, S-L. et al. Exclusive breastfeeding is associated with reduced cow's milk sensitization in early childhood. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 25, n. 5, p. 456-461, Aug. 2014.

LIEM, J. J. et al. The risk of developing food allergy in premature or low-birth-weight children. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 5, p. 1203-1209, May. 2007.

LIFSCHITZ, C.; SZAJEWSKA, H. Cow's milk allergy: evidence-based diagnosis and management for the practitioner. **European Journal of Pediatrics**, v. 174, n. 2, p. 141-150, 2015.

LINS, M. G. M. et al. Oral food challenge test to confirm the diagnosis of cow's milk allergy. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 4, p. 285-289, 2010.

LIU, X. et al. Gene–vitamin D interactions on food sensitization: a prospective birth cohort study. **Allergy**, v. 66, n. 11, p. 1442-1448, Nov. 2011.

LODGE, C. I. et al. Breastfeeding and asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. **Acta Paediatrica**, v. 104, n. 467, p. 38-53, Dec. 2015.

LU, M. P. et al. Association Study on IL4, IL13 and IL4RA Polymorphisms in Mite-Sensitized Persistent Allergic Rhinitis in a Chinese Population. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27363, 2011.

LUCAS A, MCLAUGHLAN P, COOMBS RR. Latent anaphylactic sensitisation of infants of low birth weight to cows' milk proteins. **British Medical Journal (Clinical Research Edition)**, v. 10, n. 289(6454), p. 1254-1256, Nov. 1984.

LY, N. P. et al. Gut microbiota, probiotics, and vitamin D: Interrelated exposures influencing allergy, asthma, and obesity? **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 5, p. 1087-1094, May. 2011.

LYON, H. et al. IL10 gene polymorphisms are associated with asthma phenotypes in children. **Genetic Epidemiology**, v. 26, n. 2, p. 155-165, Feb. 2004.

MAREK, A. et al. TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) in chronic inflammatory conditions – a new diagnostic and prognostic marker? **Medical Science Monitor**, v. 8, n. 7, p. 145-151, 2002.

MARRS, T. et al. Is there an association between microbial exposure and food allergy? A systematic review. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 24, n. 4, p. 311-320, 2013.

MARSH, D. G. et al. Linkage Analysis of IL4 and Other Chromosome 5q31.1 Markers and Total Serum Immunoglobulin E Concentrations. **Science**, v. 264, n. 5162, p. 1152-1156, May 1994.

MARTINO, D. et al. Epigenome-wide association study reveals longitudinally stable DNA methylation differences in CD4+ T cells from children with IgE-mediated food allergy. **Epigenetics**, v. 9, n. 7, p. 998-1006, Jul. 2014.

MARTINO, D. J.; PRESCOTT, S. L. Silent mysteries: epigenetic paradigms could hold the key to conquering the epidemic of allergy and immune disease. **Allergy**, v. 65, n. 1, p. 7-15, Jan. 2010.

MARTINO, M. et al. Food allergy in preterm infants fed human milk. **Biology of the Neonate**, v. 56, n. 6, p. 301-305, 1989.

MARTORELL, A. et al. The predictive value of specific immunoglobulin E levels in serum for the outcome of the development of tolerance in cow's milk allergy. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 36, n. 6, p. 325-330, Nov./Dec. 2008.

MARTORELL-ARAGONÉS, A. et al. Position document: IgE-mediated cow's milk allergy. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 43, n. 5, p.507-526, Sep./Oct. 2015.

MAVROUDI, A.; XINIAS, I. Dietary interventions for primary allergy prevention in infants. **Hippokratia**, v. 15, n. 3, p. 216-222, Jul. 2011.

MCGRATH, J. J. et al. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 121, n. 1-2, p. 471-477, Jul. 2010.

MCLOUGHLIN, R. M.; MILLS, K. H. G. Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 5, p. 1097-1107, May 2011.

MEHR, S. et al. Safety and clinical predictors of reacting to extensively heated cow's milk challenge in cow's milk-allergic children. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 113, n. 4, p. 425-429, Oct. 2014.

MELÉN, E. et al. Interaction between variants in the interleukin-4 receptor alpha and interleukin-9 receptor genes in childhood wheezing: evidence from a birth cohort study. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, n. 11, p. 1391-1398, Nov. 2006.

MELO, K. M.; CARVALHO, B.T. C. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 32, n. 5, p. 184-188, 2009.

MENG, J. et al. Association of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Single Nucleotide Polymorphism C-509T with Allergy and Immunological Activities. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 138, n. 2, p. 151-160, Oct. 2005.

MENZIES-GOW, A. et al. Interactions between eotaxin, histamine and mast cells in early microvascular events associated with eosinophil recruitment to the site of allergic skin reactions in humans. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 34, n. 8, p. 1276-1282, Aug. 2004.

MEYER, R.; SCHWARZ, C.; SHAH, N. A review on the diagnosis and management of food-induced gastrointestinal allergies. **Current Allergy & Clinical Immunology**, v. 25, n. 1, p. 10-17, Mar. 2012.

MICELI SOPO, S. et al. A multicentre retrospective study of 66 Italian children with food protein-induced enterocolitis syndrome: different management for different phenotypes. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 42, n. 8, p. 1257-1265, Aug. 2012.

MICELI SOPO, S. et al. Clinical management of food protein-induced enterocolitis syndrome. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 14, n. 3, p. 240-245, Jun. 2014.

MINNITI, F. et al. Breast-Milk Characteristics Protecting Against Allergy. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 14, n. 1, p. 9-15, Mar. 2014.

MIRZAKHAN, H. et al. Vitamin D and the development of allergic disease: how important is it? **Clinical & Experimental Allergy**, v. 45, n. 1, p. 114-125, Jan. 2015.

MONJARAZ, E. M. T. et al. Factores perinatales asociados al desarrollo de alergia a las proteínas de la leche de vaca. **Revista de Gastroenterología de México**, v. 80, n. 1, p. 27-31, Jan./Mar. 2015.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annuals Review of Immunology**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MOSER, A. M.; SALZER, H. J.; KRAUSE, R. Immunoplasticity--triggers of regulatory function. **Medical Hypotheses**, v. 77, n. 6, p. 1145-1147, Dec. 2011.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological Reviews**, v. 226, p. 205-218, 2008.

MOTIRA, Y. et al. Milk allergy in the neonatal intensive care unit: comparison between premature and full-term neonates. **Asia Pacific Allergy**, v. 3, n. 1, p. 35-41, Jan. 2013.

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 4, p. 331-341, Apr. 2003.

MURARO, A. et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines. Primary prevention of food allergy. **Allergy**, v. 69, n. 5, p. 590-601, May 2014.

NAROZNA, B. et al. Polymorphisms in the interleukin 4, interleukin 4 receptor and interleukin 13 genes and allergic phenotype: A case control study. **Advances in Medical Sciences**, v. 61, n. 1, p. 40-45, Mar. 2016.

NEGORO, T. et al. Influence of SNPs in cytokine-related genes on the severity of food allergy and atopic eczema in children. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 17, n. 8, p. 583-590, Dec. 2006.

NELMS, K. et al. The IL-4 receptor: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 701-738, 1999.

NEUTRA, M. R. Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. **American Journal of Physiology**, v. 274, n. 5, p. G785-G791, May 1998.

NGOC, L. P. et al. Cytokines, allergy, and asthma. **Current Opinion in Allergy and Clinical immunology**, v. 5, n. 2, p. 161-166, Apr. 2005.

NICOLAOU, N.; TSABOURI, S.; PRIFTIS, K. N. Reintroduction of cow's milk in milk-allergic children. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets**, v. 14, n. 1, p. 54-62, Mar. 2014.

NIGGEMANN, B.; BEYER, K. Diagnosis of Food Allergy in Children: Toward a Standardization of Food Challenge. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 45, n. 4, p. 399-404, Oct. 2007.

NIMWEGEN, F. A, et al. Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 5, p. 948-955, Nov. 2011.

NOVAKOVIC, I. et al. Gene polymorphisms as markers of disease susceptibility. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 135-138, Jul. 2010.

NOWAK-WĘGRZYN, A. et al. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 5, p. 1114-1124, May 2015.

NOWAK-WĘGRZYN, A. Food protein-induced enterocolitis syndrome and allergic proctocolitis. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 36, n. 3, p. 172-184, May/Jun. 2015.

ODIJK, J. et al. 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**, v. 58, n. 9, p. 833-843, Sep. 2003.

ORTIZ, R. A.; BARNES, K. C. Genetics of Allergic Diseases. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 35, n. 1, p. 19-44, Feb. 2015.

OYOSHI, M. K. et al. Food allergy: Insights into etiology, prevention, and treatment provided by murine models. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 2, p. 309-317, Feb. 2014.

PABST, O.; MOWAT, A. M. Oral tolerance to food protein. **Mucosal Immunology**, v. 5, n. 3, p. 232-239, 2012.

PALMER, D. J.; PRESCOTT, S. L. Does early feeding promote development of oral tolerance? **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 12, n. 4, p. 321-331, Aug. 2012.

PALOMARES, O. The role of regulatory T cells in IgE-mediated food allergy. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v. 23, n. 6, p. 371-382, 2013.

PANEK, M. et al. Identification and association of the single nucleotide polymorphisms, C-509T, C+466T and T+869C, of the TGF- $\beta$ 1 gene in patients with asthma and their influence on the mRNA expression level of TGF- $\beta$ 1. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 34, n. 4, p. 975-986, Oct. 2014.

PAPADOPOULOU, A. et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms and vitamin D levels with asthma and atopy in Cypriot adolescents: a case-control study. **Multidisciplinary Respiratory Medicine**, v. 10, n. 1, p. 26, Sep. 2015.

PAPATHOMA, E. et al. Cesarean section delivery and development of food allergy and atopic dermatitis in early childhood. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 27, n. 4, p. 419-424, Jun. 2016.

PELZ, B. J.; BRYCE, P. J. Pathophysiology of Food Allergy. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 6, p. 1363-1375, Dec. 2015.

PÉREZ-MACHADO, M. A. et al. Reduced transforming growth factor-beta1-producing T cells in the duodenal mucosa of children with food allergy. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 8, p. 2307-2315, Aug. 2003.

PRESCOTT, S. L. Allergic disease: understanding how in utero events set the scene. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n. 3, p. 366-372, Aug. 2010.

PRESCOTT, S. L.; SAFFERY, R. The role of epigenetic dysregulation in the epidemic of allergic disease. **Clinical Epigenetics**, v. 2, n. 2, p. 223-232, Aug. 2011.

PRESCOTT, S.; ALLEN, K. J. Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 22, n. 2, p. 155-160, Mar. 2011.

PROKESOVÁ, L. et al. Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 17, n. 3, p. 175-183, May 2006.

PYHHÖNEN, K. et al. Caesarean section and allergic manifestations: insufficient evidence of association found in population-based study of children aged 1 to 4 years. **Acta Paediatrica**, v. 102, n. 10, p. 982-989, Oct. 2013.

QUAKE, C.; NADEAU, K. C. The role of epigenetic mediation and the future of food allergy research. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 43, p. 125-130, Jul. 2015.

READLER, D. et al. IL10 polymorphisms influence neonatal immune responses, atopic dermatitis, and wheeze at age 3 years. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 3, p. 789-796, Mar. 2013.

REES, L. E. N. et al. The interleukin-10 – 1082G/A polymorphism: allele frequency in different populations and functional significance. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 3, p. 560-569, Mar. 2002.

REID-LOMBARDO, K. M.; PETERSEN, G. M. Understanding genetic epidemiologic association studies Part 1: Fundamentals. **Surgery**, v. 147, n. 4, p. 469-474, Apr. 2010.

RESCIGNO, M. Dendritic cells in oral tolerance in the gut. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 1312–1318, Sep. 2011.

REUSS, E. et al. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors – a twin study. **Genes and Immunity**, v. 3, n. 7, p. 407-413, Nov. 2002.

ROBISON, R.; KUMAR, R. The effect of prenatal and postnatal dietary exposures on childhood development of atopic disease. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 10, n. 2, p. 139-144, Apr. 2010.

ROCHA, A. P. et al. Polimorfismos Genéticos: Implicações na Patogênese do Carcinoma Medular de Tireóide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 5, p. 723-730, 2007.

ROTHERS, J. et al. Cord blood 25-hydroxyvitamin D levels are associated with aeroallergen sensitization in children from Tucson, Arizona. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 5, p. 1093-1099, Nov. 2011.

RYAN, J. W.; ANDERSON, P. H.; MORRIS, H. A. Pleiotropic Activities of Vitamin D Receptors - Adequate Activation for Multiple Health Outcomes. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 36, n. 2, p. 53-61, May 2015.

SAARINEN, K. M. et al. Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 4, p. 869-875, Oct. 2005.

SAARINEN, K. M. et al. Supplementary feeding in maternity hospitals and the risk of cow's milk allergy: A prospective study of 6209 infants. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 104, n. 1, p. 457-61, 1999.

SACKESSEN, C. Epidemiology of cow's Milk allergy: has it changed? **Clinical and Translational Allergy**, v. 1, n. 1, p. 550, 2011.

SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? **International Immunology**, v. 21, n. 10, p. 1105-1111, 2009.

SAMPAIO, G. et al. Transient vs persistent cow's milk allergy and development of other allergic diseases. **Allergy**, v. 60, n. 3, p. 410-411, Mar. 2005.

SÁNCHEZ-VALVERDE, F. et al. The impact of caesarean delivery and type of feeding on cow's milk allergy in infants and subsequent development of allergic march in childhood. **Allergy**, v. 64, n. 6, p. 884-889, Jun. 2009.

SAVAGE, J.; JOHNS, C. B. Food allergy: epidemiology and natural history. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 35, n. 1, p. 45-59, Feb. 2015.

SAVILAHTI, E. M.; SAVILAHTI, E. Development of natural tolerance and induced desensitization in cow's milk allergy. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 24, n. 2, p. 114-121, Mar. 2013.

SCHOEMAKER, A. A. et al. Incidence and natural history of challenge-proven cow's milk allergy in European children – EuroPrevall birth cohort. **Allergy**, v. 70, n. 8, p. 963-972, Aug. 2015.

SENTSOVA, T. et al. Allelic variants of the VDR gene in polymorphic sites BsmI, TaqI, FokI and TGFβ1 levels in children with food allergy. **Food Allergy and Anaphylaxis Meeting (FAAM)**, v. 9, 2014.

SHAKHAR, G.; KOLESNIKOV, M. Intestinal macrophages and DCs close the gap on tolerance. **Immunity**, v. 40, n. 2, p. 171-173, 2014.

SHEK, L. P., et al. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. **Allergy**, v. 60, n. 7, p. 912-919, Jul. 2005.

SHIN, H. D. et al. Interleukin-10 haplotype associated with total serum IgE in atopic dermatitis patients. **Allergy**, v. 60, n. 9, p. 1146–1151, Sep. 2005.

SICHERER, S. H. et al. Genetics of peanut allergy: A twin study. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, n. 1, p. 53-56, Jul. 2000.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food allergy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. S116-S125, Feb. 2010. Suplemento 2.

SKRIPAK, J. M. et al. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 5, p. 1172–1177, Nov. 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. **Avaliação nutricional da criança e do adolescente** – Manual de Orientação / Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento de Nutrologia. São Paulo: Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento de Nutrologia, 2009. 112 p.

SOHI, D. K.; WARNER, J. O. Understanding allergy. **Paediatrics and Child Health**, v. 18, n. 7, 301-308, 2008.

- SOMMANUS, S. et al. Cow's milk protein allergy: immunological response in children with cow's milk protein tolerance. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 32, n. 2, p. 171-177, Jun. 2014.
- SPERGEL, J. M., Natural history of cow's milk allergy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 3, p. 813-814, Mar. 2013.
- SRIPICHAI, O.; FUCHAROEN, S. Genetic polymorphisms and implications for human diseases. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 90, n. 2, p. 394-398, Feb. 2007.
- STEELE, L.; MAYER, L.; BERIN, C. Mucosal immunology of tolerance and allergy in the gastrointestinal tract. **Immunologic Research**, v. 54, n. 1-3, p. 75-82, Dec. 2012.
- STROBEL, S.; MOWAT, A. M. Oral tolerance and allergic responses to food proteins. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 6, n. 3, p. 207-213, Jun. 2006.
- SUAINI, N. H. A. et al. Environmental and genetic determinants of vitamin D insufficiency in 12-month-old infants. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 144, p. 445-454, Oct. 2014.
- \_\_\_\_\_. Immune Modulation by Vitamin D and Its Relevance to Food Allergy. **Nutrients**, v. 7, n. 8, p. 6088-6108, Jul. 2015.
- TAKAHASHI, K. et al. Human neutrophils express messenger RNA of vitamin D receptor and respond to 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. **Immunopharmacology & Immunotoxicology**, v. 24, n. 3, p. 335-347, Aug. 2002.
- TAN, J. K.; O'NEILL, H. C. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 2, p. 319-324, Aug. 2005.
- TAN, T. H. et al. The role of genetics and environment in the rise of childhood food allergy. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 42, n. 1, p. 20-29, Jan. 2012.
- TAYLOR, S. N. et al. Intestinal Permeability in Preterm Infants by Feeding Type: Mother's Milk Versus Formula. **Breastfeeding Medicine**, v. 4, n. 1, p. 11-15, Mar. 2009.
- THYGARAJAN, A.; BURKS, A. W. American Academy of Pediatrics recommendations on the Effects of Early Nutritional Interventions on the Development of Atopic Disease. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 20, n. 6, p. 698-702, Dec. 2008.
- TRIFUNOVIĆ, J. et al. Pathologic patterns of interleukin 10 expression – A review. **Biochemia Medica**, v. 25, n. 1, p. 36-48, 2015.
- TSABOURI, S. et al. Modulation of gut microbiota downregulates the development of food allergy in infancy. **Allergol Immunopathol**, v. 42, n. 1, p. 69-77, Jan./Feb. 2014.
- TSABOURI, S.; DOUROS, K.; PRIFTIS, K. N. Cow's Milk Allergenicity. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 14, n. 1, p. 16-26, Mar. 2014.



TSAI, H. J. et al. Familial aggregation of food allergy and sensitization to food allergens: a family-based study. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 1, p. 101-109, Jan. 2009.

UITTERLINDEN, A. G. et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene**, v. 338, n. 2, p. 143-156, Sep. 2004.

VALDIVIELSO, J. M.; FERNANDEZ, E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. **Clinical Chimica Acta**, v. 371, n. 1-2, p. 1-12, Sep. 2006.

VAN DYKEN, S. J.; LOCKSLEY, R. M. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 317-343, 2013.

VANDENPLAS, Y.; MARCHAND, J.; MEYNS, L. Symptoms, Diagnosis, and Treatment of Cow's Milk Allergy. **Current Pediatric Reviews**, v. 11, n. 4, p. 293-297, 2015.

VANTO, T. et al. Prediction of the development of tolerance to milk in children with cow's milk hypersensitivity. **The Journal of Pediatrics**, v. 144, n. 2, p. 218-222, Feb. 2004.

VASSALLO, M. F.; CAMARGO JR, C. A. Potential mechanisms for the hypothesized link between sunshine, vitamin D, and food allergy in children. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 2, p. 217-222, Aug. 2010.

VICKERY, B. P. et al. Mechanisms of immune tolerance relevant to food allergy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 3, p. 576-584, Mar. 2011.

VIEIRA, M. C. et al. Survey on clinical presentation and nutritional status of infants with suspected cow' milk allergy. **BMC Pediatrics**, v. 10, p. 25, Apr. 2010.

VITALITI, G. et al. The immunopathogenesis of cow's milk protein allergy (CMPA). **Italian Journal of Pediatrics**, v. 38, p. 35, 2012.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. Regulatory T cells, transforming growth factor-beta, and immune suppression. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 4, n. 3, p. 271-276, Jul. 2007.

WEAVER, L. T.; LAKER, M. F.; NELSON, R. Intestinal permeability in the newborn. **Archives of Disease in Childhood**, v. 59, p. 236-241, 1984.

WEI, R.; CHRISTAKOS, S. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. **Nutrients**, v. 7, n. 10, p. 8251-8260, Sep. 2015.

WEISSE, K. et al. Maternal and newborn vitamin D status and its impact on food allergy development in the German LINA cohort study. **Allergy**, v. 68, n. 2, p. 620-628, Feb. 2013.

WIJK, F. V.; KNIPPELS, L. Initiating mechanisms of food allergy: Oral tolerance versus allergic sensitization. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, n. 1, p. 8-20, Jan. 2007.

WILLIAMS, M. A. et al. Introduction to genetic epidemiology. **Optometry**, v. 82, p. 83-91, 2011.

WJST, M. Introduction of oral vitamin D supplementation and the rise of the allergy pandemic. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 5, n. 8, p. 1-5, 2009.

WOOD, R. A. et al. The natural history of milk allergy in an observational cohort. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 3, p. 805-812, Mar. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multicentre growth reference study group. WHO Child growth standards based on length/height and age. **Acta Paediatrica**, v. 450, p. 76-85, 2006. Suplemento.

YANG, M. et al. Severe Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome to Cow's Milk in Infants. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2016.

YAVUZ, S. T. et al. Factors that predict the clinical reactivity and tolerance in children with cow's milk allergy. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 110, n. 4, p. 284-289, Apr. 2013.

YEPES-NUÑEZ, J. J. et al. World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Vitamin D. **World Allergy Organization Journal**, v. 9, p. 17, 2016.

YU, Q. H.; YANG, Q. Diversity of tight junctions (TJs) between gastrointestinal epithelial cells and their function in maintaining the mucosal barrier. **Cell Biology International**, v. 33, n. 1, p. 78-82, Jan. 2009.

ZHENG, X. Y. et al. Interleukin-10 Promoter 1082/-819/-592 Polymorphisms are Associated with Asthma Susceptibility in Asians and Atopic Asthma: A Meta-Analysis. **Lung**, v. 192, n. 1, p. 65-73, Feb. 2014.

ZHU, S. et al. Polymorphisms of the IL-4, TNF $\alpha$ , and Fc $\epsilon$ RI $\beta$  Genes and the Risk of Allergic Disorders in At-risk Infants. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 5, p. 1655-1659, May 2000.

ZMUDA, J. M.; CAULEY, J. A.; FERRELL, R. E. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. **Epidemiologic Reviews**, v. 22, n. 2, p. 203-217, 2000.

## APÊNDICE A

### FORMULÁRIO DA PESQUISA

#### INTERAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO GENÉTICO, ALEITAMENTO MATERNO E VITAMINA D NA TRANSITORIEDADE OU PERSISTÊNCIA DA ALERGIA À PROTEÍNA DO LEITE DE VACA EM CRIANÇAS

Número do questionário: \_\_\_\_\_ Ambulatório: \_\_\_\_\_  
 Data da entrevista: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_  
 Nome da criança: \_\_\_\_\_  
 Nome da mãe/responsável: \_\_\_\_\_  
 Sexo: 1. Masculino ☐ 2. Feminino ☐  
 Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade (anos e meses): \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ Telefone para contato: (    ) \_\_\_\_\_

#### DADOS SOCIOECONÔMICOS DA FAMÍLIA

Grau de escolaridade da mãe:

1. Não estudou ☐
2. Ensino fundamental I incompleto ☐
3. Ensino fundamental I completo ☐
4. Ensino fundamental II incompleto ☐
5. Ensino fundamental II completo ☐
6. Ensino médio incompleto ☐
7. Ensino médio completo ☐
8. Ensino superior incompleto ☐
9. Ensino superior completo ☐

Grau de escolaridade do pai:

1. Não estudou ☐
2. Ensino fundamental I incompleto ☐
3. Ensino fundamental I completo ☐
4. Ensino fundamental II incompleto ☐
5. Ensino fundamental II completo ☐
6. Ensino médio incompleto ☐
7. Ensino médio completo ☐
8. Ensino superior incompleto ☐
9. Ensino superior completo ☐

Profissão do pai: \_\_\_\_\_ Trabalha atualmente: 1. Sim ☐ 2. Não ☐

Profissão da mãe: \_\_\_\_\_ Trabalha atualmente: 1. Sim ☐ 2. Não ☐

Qual a renda da família? \_\_\_\_\_

Quantas pessoas moram na casa? \_\_\_\_\_

Sua casa é: 1. Própria ☐ 2. Alugada ☐ 3. Cedida por outros ☐ 4.

Outro \_\_\_\_\_ ☐

Recebe benefícios sociais do governo? 1. Sim ☐ 2. Não ☐

Se sim, qual? \_\_\_\_\_

**DADOS PERINATAIS**A mãe fez acompanhamento médico pré-natal? 1. Sim ☐ 2. Não ☐Usou suplemento polivitamínico durante a gestação? 1. Sim ☐ 2. Não ☐Usou suplemento de vitamina D durante a gestação? 1. Sim ☐ 2. Não ☐

Se sim, qual a dose tomada? \_\_\_\_\_ Por quanto tempo? \_\_\_\_\_

Tempo de gestação: \_\_\_\_\_

Gestação: 1. a termo ☐ 2. Pré-maturo ☐ 3. pós-termo ☐Tipo de parto: 1. Normal ☐ 2. Cesário ☐A mãe da criança tem algum tipo de alergia? 1. Sim ☐ 2. Não ☐Se sim, qual o tipo? 1. Rinite alérgica ☐ 2. Asma ☐ 3. Medicamento ☐4. Urticária ☐ 5. Dermatite atópica ☐ 6. Alimento ☐ 7. Outro \_\_\_\_\_ ☐O pai da criança tem algum tipo de alergia? 1. Sim ☐ 2. Não ☐Se sim, qual o tipo? 1. Rinite alérgica ☐ 2. Asma ☐ 3. Medicamento ☐4. Urticária ☐ 5. Dermatite atópica ☐ 6. Alimento ☐ 7. Outro \_\_\_\_\_ ☐**DADOS DA CRIANÇA**

Peso ao nascimento: \_\_\_\_\_g Comprimento ao nascimento: \_\_\_\_\_cm

A criança toma algum polivitamínico? 1. Sim ☐ 2. Não ☐A criança foi alimentada com leite materno? 1. Sim ☐ 2. Não ☐

Se sim, por quanto tempo foi alimentada apenas com leite materno? \_\_\_\_\_

Com que idade começou a introduzir outros líquidos como sucos, chás e água? \_\_\_\_\_

Com que idade começou a introduzir alimentos sólidos (frutas/verduras/sopa)? \_\_\_\_\_

Se sim, com que idade começou a introduzir outro tipo de leite? \_\_\_\_\_

Qual o tipo de leite oferecido à criança inicialmente? \_\_\_\_\_

Qual o tipo de leite oferecido a criança atualmente? \_\_\_\_\_

Com que idade começou a adicionar massas no leite? \_\_\_\_\_

A criança é exposta ao sol? 1. Sim ☐ 2. Não ☐

Se sim, quantas vezes na semana? \_\_\_\_\_ Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Dieta da criança:

---



---



---



---



---



---



---



---

**AValiação ANTROPOMÉTRICA DA CRIANÇA (1ª AVALIAÇÃO)**

Peso atual: \_\_\_\_\_g Comprimento atual: \_\_\_\_\_cm PC: \_\_\_\_\_cm PT: \_\_\_\_\_cm

P/A: \_\_\_\_\_ Classificação: \_\_\_\_\_

P/I: \_\_\_\_\_ Classificação: \_\_\_\_\_

A/I: \_\_\_\_\_ Classificação: \_\_\_\_\_

**DADOS DA MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA APLV**

Quais os sintomas da criança associados com o consumo de leite de vaca/leite materno?

1. Vômitos ☐
2. Diarreia ☐
3. Distensão abdominal ☐
4. Constipação intestinal ☐
5. Refluxo ☐
6. Dermatite atópica ☐
7. Edema nos lábios/olhos ☐
8. Urticária ☐
9. Tosse ☐
10. Sangramento nas fezes ☐
10. Cansaço/falta de ar ☐
11. Crise anafilática ☐
12. Outro \_\_\_\_\_ ☐

Qual a idade da criança no início dos sintomas? \_\_\_\_\_

As manifestações começavam quanto tempo após o início dos sintomas? \_\_\_\_\_

**CONDUTA NUTRICIONAL**


---



---

**TESTE DE DESENCADEAMENTO ALIMENTAR ORAL ABERTO (TRIAGEM)**

Data do teste: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

A criança apresentou sintoma (s) de reação alérgica após 2 semanas de dieta isenta de leite de vaca e derivados? 1. Sim ☐ 2. Não ☐

Se sim, qual o sintoma apresentado? \_\_\_\_\_

Se sim, quantas vezes a criança apresentou o(s) sintoma (s)? \_\_\_\_\_

Resultado do teste: 1. Positivo ☐ 2. Negativo ☐

Em caso de positivo, qual o sintoma apresentado? \_\_\_\_\_

**DADOS LABORATÓRIAS**Dosagem sérica da 25 hidroxivitamina D<sub>3</sub>: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_Classificação: 1. Deficiência ☐ 2. Insuficiente ☐ 3. Adequado ☐**1º ENTREVISTA (ACOMPANHAMENTO PÓS TESTE)**

DATA DA ENTREVISTA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA DA CRIANÇA (2ª AVALIAÇÃO)**

Peso atual: \_\_\_\_\_ g Comprimento atual: \_\_\_\_\_ cm PC: \_\_\_\_\_ cm PT: \_\_\_\_\_ cm

P/A: \_\_\_\_\_ Classificação: \_\_\_\_\_

P/I: \_\_\_\_\_ Classificação: \_\_\_\_\_

A/I: \_\_\_\_\_ Classificação: \_\_\_\_\_

A criança apresentou sintomas após a realização do teste? 1. Sim ☐ 2. Não ☐

Se sim, qual o sintoma apresentado? \_\_\_\_\_

Se sim, em quanto tempo depois a criança começou a apresentar o sintoma? \_\_\_\_\_

Se sim, por quantas vezes a criança apresentou o sintoma? \_\_\_\_\_

Dieta atual da criança:

---



---



---

## APÊNDICE B

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o(a) seu/sua filho (a) que está sob sua responsabilidade para participar, como voluntário (a), da pesquisa intitulada ***INTERAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO GENÉTICO E VITAMINA D NA TRANSITORIEDADE OU PERSISTÊNCIA DA ALERGIA À PROTEÍNA DO LEITE DE VACA EM CRIANÇAS***. Esta pesquisa é orientada pelo pela Prof<sup>ª</sup> Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho e está sob a responsabilidade da pesquisadora Silvia Alves da Silva, residente na Rua Joaquim Elisio Maia e Silva, 215, Bairro Novo, Olinda. E-mail: [silviaalvessilva@hotmail.com](mailto:silviaalvessilva@hotmail.com), para contato do pesquisador responsável (inclusive ligações a cobrar): (81) 9297-1269/9995-3151.

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr.(a) não será penalizado (a) de forma alguma.

#### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Esta pesquisa pretende avaliar a interação entre os polimorfismos dos genes que determinam os tipos de respostas imunológicas alérgicas, bem como nos genes que determinam a reposta imune tolerogênica e a prática de aleitamento materno no desenvolvimento e persistência da alergia à proteína do leite de vaca em crianças menores de um ano de idade, considerando o fenótipo dos sintomas.

Os dados serão coletados a partir da aplicação de um questionário durante a consulta médica e nutricional e mediante a coleta de 5mL de sangue para a realização da dosagem dos níveis da vitamina D e identificação de polimorfismos genéticos, além da realização de testes de desencadeamento alimentar com leite de vaca, necessário para o diagnóstico da alergia à proteína do leite de vaca e, posteriormente para a identificação do desenvolvimento da tolerância ao leite.

As informações obtidas na pesquisa trarão benefícios para as crianças com APLV, pois ajudará a conhecer melhor o impacto dos polimorfismos genéticos e sua interação com o aleitamento materno no desenvolvimento de tolerância ao leite de vaca. Também ajudará a criar estratégias terapêuticas mais específicas, de acordo com o polimorfismo genético apresentado e o tipo dos sintomas, o que pode contribuir para um menor custo no tratamento e melhorar a qualidade de vida da criança.

Vale salientar que esta pesquisa apresenta risco mínimo, em vista que a coleta de sangue será realizada por um profissional de enfermagem com treinamento e experiência em pediatria e o volume de 5 mL de sangue puncionado para a dosagem da vitamina D e determinação dos polimorfismos genéticos é considerado baixo e não acarretará em prejuízos ao volume sanguíneo total da criança. Além disso, os demais procedimentos são rotineiros no atendimento a crianças com alergia à proteína do leite de vaca. No entanto, em caso de eventual dano a integridade física da criança durante a coleta de informações da pesquisa, a família será indenizada financeiramente pela pesquisadora responsável.

Este estudo não acarretará nenhum custo financeiro ao responsável das crianças, como também não possui fins lucrativos. Os pais ou responsáveis das crianças poderão desistir da participação da pesquisa em qualquer momento, sem que isso acarrete em prejuízo ao seu acompanhamento clínico e nutricional.

Os questionários contendo as informações coletadas serão armazenados por um prazo de 5 anos no Departamento da Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da

Universidade Federal de Pernambuco, sob a responsabilidade da orientadora da pesquisa Prof<sup>a</sup> Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho e após esse prazo serão incinerados.

Será garantindo sigilo e privacidade em relação ao seu nome, obedecendo dessa maneira as normas estabelecidas pela Resolução nº 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, que trata sobre a condução das pesquisas envolvendo seres humanos (BRASIL, Conselho Nacional de Saúde, 1996).

Informamos ainda que os dados coletados poderão ser apresentados em eventos científicos de âmbito nacional e internacional e divulgados em revistas científicas.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, Sala 4 – Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

---

Silvia Alves da Silva

### **CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO**

Eu, \_\_\_\_\_, RG/ CPF/\_\_\_\_\_, abaixo assinado, responsável pelo(a) menor \_\_\_\_\_, autorizo a sua participação nesta pesquisa como voluntário(a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação dele (a). Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de seu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data \_\_\_\_\_

Nome e Assinatura do (da) responsável: \_\_\_\_\_

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.**

02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:



**ANEXO A**  
**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Interação entre polimorfismo genético, aleitamento materno e vitamina D na transitoriedade ou persistência da alergia à proteína do leite de vaca

**Pesquisador:** Sílvia Alves da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 12878313.4.0000.5208

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Patrocinador Principal:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 237.609

**Data da Relatoria:** 03/04/2013

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do CCS da UFPE. O projeto tem como título: Interação entre polimorfismo genético, aleitamento materno e vitamina D na transitoriedade ou persistência da alergia à proteína do leite de vaca.

O estudo será desenvolvido nos Serviços de Gastroenterologia e Alergologia Pediátrica do Ambulatório de Pediatria do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE). A população de estudo será constituída por lactentes menores de um ano de idade com APLV nos fenótipos gastrointestinal e cutâneo/respiratório/anafilaxia e lactentes da mesma faixa etária sem APLV. Na coleta de dados será utilizado um formulário específico contendo informações acerca da identificação da criança quanto ao gênero, idade, cor da pele, do período perinatal (suplementação de vitamina D pela mãe, tipo de parto, tempo de gestação, peso e comprimento de nascimento) e de lactente (duração do aleitamento materno exclusivo, predominante e total, exposição solar, suplementação de vitamina D, uso de antibiótico e história de reações alérgicas). Além de avaliação antropométrica (peso atual e comprimento), também serão coletadas informações acerca do grau de escolaridade dos pais, renda familiar, condições de moradia da família e história de atopia familiar. Os lactentes menores de um ano de idade com suspeita de apresentarem sintomas gastrointestinais, cutâneos, respiratórios ou anafilaxia pelo consumo de leite de vaca serão convidados a participar da pesquisa, após esclarecimentos do protocolo de estudo, e assinarão o termo de consentimento livre e esclarecido para sua inclusão. Esses

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.740-600

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-8588

**Fax:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



pacientes serão submetidos ao teste de desencadeamento oral aberto com leite de vaca, em ambiente hospitalar, após duas semanas de exclusão completa do leite de vaca da alimentação e usando fórmula infantil para tratamento de APLV, conforme protocolo estabelecido por Niggemann & Beyer, modificado no tempo de observação para definição diagnóstica: a) para lactentes com reação tardia, doses progressivas até 100 ml (1,0 3,0 10,0 30,0 100,0 ml a cada 30 minutos); b) para lactentes com reação imediata, doses menores progressivas até 100 ml (0,1 0,3 1,0 3,0 10,0 30,0 100,0 ml) a cada 30 minutos. Se os sintomas não aparecerem durante a observação médica, o paciente continuará o consumo de leite em casa, com um mínimo de 200 ml por dia, com visita semanal de retorno até quatro semanas. Lactentes confirmados com APLV serão acompanhados mensalmente, de forma regular, com atendimento por gastroenterologista e alergistas pediátricos e nutricionista, mantidos em dieta de exclusão de leite de vaca e derivados e usando fórmula infantil para tratamento de APLV. A fim de determinar o desenvolvimento de tolerância ao leite de vaca, será realizado novo teste de desencadeamento oral aberto com leite de vaca a cada dois meses para lactentes com sintomas iniciais do trato digestório e a cada seis meses para lactentes com sintomas iniciais de outros órgãos e sistemas. O acompanhamento inicial será de até 12 meses. Será considerada transitoriedade da APLV quando o teste de desencadeamento oral aberto com leite de vaca for negativo até o final dos 12 meses de acompanhamento, assumindo-se como amadurecimento do sistema imune e obtenção da tolerância oral. Persistência da APLV será admitida quando o teste continuar positivo até o final dos 12 meses de acompanhamento, assumindo-se como ausência de tolerância oral. A conclusão de transitoriedade ou persistência será definida para cada fenótipo clínico, relacionando-os com o polimorfismo genético para resposta imune Th1, Th2 e tolerância oral. Os pacientes atendidos no Ambulatório de Pediatria e Puericultura do HC-UFPE que irão coletar sangue e não tenham sintomas gastrintestinais, respiratórios ou eczema também serão convidados a participar da pesquisa, após esclarecimentos do protocolo de estudo e assinatura do termo de consentimento para sua inclusão no grupo controle.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar a interação entre os polimorfismos dos genes que codificam as respostas imunes Th1 (IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4) com a presença de polimorfismos nos genes que codificam a resposta imune tolerogênica (IL-10 e receptor para a vitamina D) e o aleitamento materno no desenvolvimento e persistência de alergia às proteínas do leite de vaca (APLV) em lactentes menores de um ano de idade, considerando o fenótipo dos sintomas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: O presente projeto apresenta risco mínimo (dor local), em vista que a coleta de sangue será

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.740-600

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-8588

**Fax:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



realizada por um profissional de enfermagem com treinamento e experiência em pediatria e o volume de 5 mL de sangue puncionado para a dosagem da vitamina D e determinação dos polimorfismos genéticos é considerado baixo e não acarretará em prejuízos ao volume sanguíneo total da criança. Além disso, os demais procedimentos como acompanhamento de peso, comprimento e aplicação de questionário serão realizados durante a consulta com a equipe médica/nutricionista em sala reservada garantindo a confidencialidade das informações prestadas. O teste de desencadeamento alimentar oral aberto será realizado em ambiente hospitalar, e a criança sendo monitorada por enfermeiro, médico pediatra e nutricionista, durante as 24 horas de duração do teste e o mesmo será suspenso caso a criança apresente os sintomas referidos pela família. O teste segue o protocolo recomendado atualmente pela Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN)

**Benefícios:** As informações obtidas na pesquisa trarão benefícios para as crianças com APLV, pois ajudará a conhecer melhor o impacto dos polimorfismos genéticos e sua interação com o aleitamento materno no desenvolvimento de tolerância ao leite de vaca. Também ajudará a criar estratégias terapêuticas mais específicas, de acordo com o polimorfismo genético apresentado e o fenótipo dos sintomas, o que pode contribuir para um menor custo no tratamento e melhorar a qualidade de vida da criança. Para a comunidade científica, esses dados serão publicados na forma de artigos científicos de circulação internacional.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um projeto bem escrito, com clareza em todos os seus itens. Está aprovado financeiramente pelo CNPq. De acordo com o projeto, atualmente, as dietas de exclusão de leite de vaca na APLV são realizadas por períodos padronizados e prolongados, superiores a seis meses, indiscriminadamente, independente do fenótipo clínico. Muitos pacientes acabam apresentando repercussões nutricionais, desde desnutrição energético-protéica, até hipocalcemia. Será útil para traçar medidas preventivas e terapêuticas dirigidas a cada fenótipo clínico, assim como ensaios clínicos que contemplem a duração ótima da dieta de exclusão e suas repercussões nutricionais. Faz-se necessário o entendimento da contribuição genética para o surgimento das doenças seja corroborado por estudos realizados em populações/etnias variadas, visto que os perfis genéticos podem diferir entre elas. As propriedades imunológicas do leite materno são indubitáveis, mas nas sociedades modernas, essa prática ocorre por períodos cada vez mais curtos. Assim a resposta tolerogênica precisa ser esclarecida para permitir orientações nutricionais personalizadas quanto à prática ideal do aleitamento materno visando reduzir o risco de APLV e outras alergias futuras na criança. Parece um projeto de relevância na área da saúde infantil porque visa reduzir o surgimento de

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

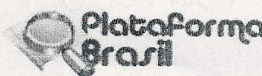
Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



doenças graves advindas da desnutrição infantil devido à alimentação inadequada juntamente com a ausência desnecessária do leite de vaca nesta alimentação.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O requerente apresentou toda a documentação exigida pelo programa. Inclusive a folha de rosto devidamente assinada, a carta de anuência e a carta do CNPq de aprovação do projeto no valor de R\$ 29.999,66.

**Recomendações:**

Recomendo aprovação do projeto sem nenhuma restrição.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado sem restrições.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, através da PLATAFORMA BRASIL ou por meio de ofício impresso emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

RECIFE, 04 de Abril de 2013

---

**Assinador por:**

**GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.740-600

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-8588

**Fax:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepccs@ufpe.br