

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

MARIA DAS GRAÇAS MOURA LINS

---

---

***ALERGIA À PROTEINA DO LEITE DE VACA EM CRIANÇAS:  
AVALIAÇÃO CLÍNICA E CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE  
INTERFERON - $\gamma$  E INTERLEUCINA-4***

---

---

RECIFE  
2010

Lins, Maria das Graças Moura

Alergia à proteína do leite de vaca em crianças: avaliação clínica e concentrações de interferon-  $\gamma$  e interleucina- 4 / Maria das Graças Moura Lins. – Recife : O Autor, 2010.

106 folhas ; II., fig., tab., graf. e quadros.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Saúde da criança e do adolescente, 2010.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. Hipersensibilidade a leite. 2. Lactente. 3. Sinais e sintomas. 4. Interferon-  $\gamma$ . 5. Interleucina- 4. I. Título.

57.083.32  
616.975

CDU (2.ed.)  
CDD (22.ed.)

UFPE  
CCS2010-146

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**REITOR**

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

**VICE-REITOR**

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

**PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DIRETOR**

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

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

Profa. Dra. Heloisa Ramos Lacerda de Melo

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO**

**COLEGIADO**

Profa. Dra. Gisélia Alves Pontes da Silva (Coordenadora)

Profa. Dra. Luciane Soares de Lima (Vice-Cordenadora)

Profa. Dra. Marília de Carvalho Lima

Profa. Dra. Sônia Bechara Coutinho

Prof. Dr. Pedro Israel Cabral de Lira

Profa. Dra. Mônica Maria Osório de Cerqueira

Prof. Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

Profa. Dra. Sylvia Wanick Sarinho

Profa. Dra. Maria Clara Albuquerque

Profa. Dra. Sophie Helena Eickmann

Profa. Dra. Ana Cláudia Vasconcelos Martins de Souza Lima

Profa. Dra. Maria Eugênia Farias Almeida Motta

Prof. Dr. Alcides da Silva Diniz

Profa. Dra. Maria Gorete Lucena de Vasconcelos

Profa. Dra. Sílvia Regina Jamelli

Profa. Dra. Cleide Maria Pontes

Adriana Azoubel Antunes (Representante Discente – Doutorado)

Thaysa Maria Gama Albuquerque Leão de Menezes (Representante Discente – Mestrado)

**SECRETARIA**

Paulo Sergio Oliveira do Nascimento

Juliene Gomes Brasileiro

Taynan Barbosa Mendes Barreto



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA  
CRIANÇA E DO ADOLESCENTE



Título:

**Alergia à proteína do leite de vaca em crianças:  
avaliação clínica e concentrações séricas de  
interferon-γ e interleucina-4.**

Nome:

**Maria das Graças Moura Lins**

Tese aprovada em: **25/05/2010**

Membros da Banca Examinadora:

Maria Eugênia Farias Almeida Motta  
Prof. Dr. Maria Eugênia Farias Almeida Motta

Gisélia Alves Pontes da Silva  
Prof. Dr. Gisélia Alves Pontes da Silva

Rosmary de Jesus M. Amorim  
Prof. Dr. Rosmary de Jesus Machado Amorim

Célia M. Machado B. Castro  
Prof. Dr. Célia Maria Machado Barbosa Castro

Aldo José Fernandes Costa  
Prof. Dr. Aldo José Fernandes Costa

Recife  
2010

*Às crianças, em especial as que participaram desta pesquisa. A maior motivação para continuar a perseguir um papel (inatingível) de artífice como pediatra.*

# Agradecimentos

---

---

Ao meu pai, Matias Lins Filho, por seu amor incondicional e incentivo na minha vida pessoal e profissional desde sempre. Tudo aconteceu e acontece por sua causa.

À minha mãe, Maria Celeste Moura Lins, pelas lições de sabedoria, simplicidade, resiliência e humor para enfrentar e superar dificuldades.

Ao meu marido Genésio, pelo apoio, confiança e, principalmente, pelo desempenho no exercício de paciência.

Aos meus filhos Tiago e Raquel, representantes da minha história, pelo imenso amor e cumplicidade. Pela inestimável colaboração em resolver os (meus) “mistérios” no universo da Informática e pelo apoio logístico em muitas outras tarefas cotidianas.

A Fernando Castim Pimentel (Nandinho) pelo carinho filial, pela cordialidade com que atendeu minhas solicitações: busca de referências, leituras, presença.

À Profa. Dra. Maria Eugênia Farias Almeida Motta, orientadora desta tese, pela competência, dedicação, respeito e até por *um certo toque de arte* ao fazer seus o tamanho de meus passos no desenvolvimento deste trabalho. Muito grata.

À Profa. Dra. Gisélia Alves Pontes da Silva, que me permitiu compartilhar, com generosidade, de sua segurança, experiência em pesquisa, pela leveza filosófica diante dos problemas, como um porto seguro para mim. Também pela estima e cuidados. Sem palavras.

Ao Prof.Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho pela amizade, atenção e esclarecimentos através do cinza *dégradé* da linguagem da Imunologia.

Aos colegas: Ana Márcia, Dilma, Margarida, Samir e Taciana. Juntos nos esforçamos no ajuste do *zoom* para olhar a natureza, em uma colaboração e harmonia inesquecível.

Aos amigos do grupo da Gastropediatria de Pernambuco: Eduarda, Eugênia, Gisélia, Kátia, Marcílio, Margarida e Michela, pelas trocas de experiências, num aprendizado contínuo, num amálgama de admiração e respeito mútuos. Obrigada.

À equipe da UTI-Neo do Hospital das Clínicas da UFPE, em especial à Dra. Lindacir Sampaio, pelo suporte nos horários de estudo e elaboração da tese e à colega, amiga e anjo da guarda Dilma Piscoya.

Ao estimado amigo e professor Fernando José Castim Pimentel, pelo carinho, dedicação e preciosa revisão dos textos.

À equipe do ambulatório de Alergia do Hospital das Clínicas da UFPE especialmente a Dra. Almerinda, Dr. Décio e Dr. Aldo pelo encaminhamento dos pacientes.

À equipe do laboratório LIKA, chefiada pela Dra. Célia Castro, pela determinação das citocinas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que financiou este projeto

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Paulo, Juliene e Taynan pela atenção durante todo o curso.

Às mães das crianças que se envolveram com a realização desta pesquisa, e também, às que colaboraram, indiretamente, como amadurecimento do meu olhar de pesquisadora. Muito obrigada.

A todos os que fazem o Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente (UFPE), pela acolhida e preciosa oportunidade vivenciadas nesta casa.

*“As the twig is bent, so the tree will grow”*

Provérbio inglês

# Resumo

---

---

**Introdução** O diagnóstico da alergia à proteína do leite de vaca através de sintomas é bastante falível, representa mais ou menos a metade dos casos suspeitos. A produção e as concentrações do Interferon- $\gamma$  e Interleucina-4 têm sido estudadas como sinalizadores das reações inflamatórias na alergia à proteína do leite de vaca em atividade e na tolerância oral com ações contrarreguladoras. **Objetivos.** 1- Determinar a frequência de alergia em crianças com sintomas de intolerância ao leite de vaca. 2 - Determinar as concentrações séricas do interferon-gama e da interleucina-4 em crianças com sintomas suspeitos de alergia à proteína do leite de vaca. **Método.** Foram estudada 65 crianças (2-84 meses), com intolerância ao leite de vaca, foram estudadas. Informações da história clínica, níveis e IgE total e específicas, Interferon- $\gamma$ , Interleucina-4 e teste do desencadeamento alimentar oral, realizado para determinação das crianças com e sem alergia à proteína do leite de vaca foram registrados em formulário estruturado. Os sintomas entre os dois grupos foram analisados. As idades e citocinas foram sumarizadas como medianas e comparadas pelo teste de Mann-Whitney. As diferenças entre as variáveis categóricas foram determinadas pelo teste qui-quadrado. Os testes estatísticos foram considerados significantes com  $p \leq 0,05$ . **Resultados.** A mediana de idade foi 5 meses (P25=2- P75=9 meses) no grupo caso e 7 meses (P25=4-P75=11 meses) no grupo comparação ( $p=0,05$ ). O teste de desencadeamento alimentar oral não confirmou alergia à proteína do leite de vaca em 46,8% dos pacientes com sintomas atribuídos à ingestão de leite de vaca. Reação tardia ocorreu em 77,1% (27/35) dos casos com teste positivo, sendo 18/27 na primeira, 3/27 na segunda e 6/27 na terceira semana de observação. Encontrou-se associação estatística significante entre manifestações cutâneas e teste positivo ( $p=0,04$ ), mas não com sintomas digestivos e respiratórios. Nas crianças acima de seis meses de idade, o nível de Interleucina-4 foi 3,49 (0,32-36,40 pg/mL) e, nas abaixo de seis meses, 2,14 pg/mL (0,33-8,12 pg/mL),  $p = 0,006$ . As concentrações de Interferon- $\gamma$  foram de 115,96 pg/mL (69,27-150,60 pg/mL) nos pacientes com alergia e 97,88 pg/mL (75,30-174,69 pg/mL) nos sem alergia ( $p=0,86$ ). A idade maior de 6 meses foi fator contribuinte para o

aumento de Interleucina-4 e explicou 7% da sua variação ( $r^2$  ajustado = 0,07;  $p < 0,05$ ), mas não contribuiu para o aumento de Interferon- $\gamma$ .

**Conclusões:** o diagnóstico da alergia à proteína do leite de vaca, baseado apenas em sintomas, é bastante falível. O estudo corrobora a necessidade do teste de desencadeamento alimentar oral para o diagnóstico da alergia à proteína do leite de vaca em crianças

As concentrações de Interleucina-4 e Interferon- $\gamma$  no sangue periférico, não diferiram entre os pacientes com e sem alergia.

**Descritores** Hipersensibilidade a leite, lactente, pré-escolar, sinais, sintomas, Interferon- $\gamma$ , Interleucina-4.

# Abstract

---

---

**Introduction** The diagnosis of cow's milk protein allergy on the basis of symptoms has proved to be considerably fallible but is used for approximately half of suspected cases. Production and levels of interferon-gamma and interleukin-4 have been studied as signs of inflammatory reactions in active cow's milk protein allergy and oral intolerance with counter-regulatory action. **Objective.** 1-To determine the frequency of allergy in children with symptoms of intolerance to cow's milk. 2-To determine the serum levels of Interferon- $\gamma$  and Interleukin-4 in children with suspected cow's milk protein allergy (CMPA). **2- Method** Sixty-five children (aged between 2 and 60 months) presenting symptoms of intolerance to cow's milk were studied. The clinical case history, levels of total and specific IgE, Interferon- $\gamma$ , Interleukin-4, and the results of an oral food challenge test, carried out to distinguish children with and without cow's milk allergy, were gathered and recorded in a standardized form. The symptoms of the two groups were then analyzed. Median age and cytokine levels were calculated and compared using the Mann-Whitney Test. The differences between the category variables were determined using the chi-square test. The statistical significance was set at  $p \leq 0.05$ . **Results** The median age was five months (P25=2- P75=9 months) in the case group and 7 months (P25=4-P75=11 months) in the comparison group ( $p=0.05$ ). The oral food challenge failed to confirm cow's milk protein allergy in 46.8% of patients with symptoms attributed to the ingestion of cow's milk. A delayed reaction occurred in 77.1% (27/35) of cases testing positively, with 18/27 occurring in the first week of observation, 3/27 in the second, and 6/27 in the third. A significant statistical association was found between cutaneous manifestations and a positive test ( $p=0.04$ ), but not in the case of digestive and respiratory symptoms. In the children aged over six months, the level of interleukin-4 was 3.49 (0.32-36.40 pg/mL) and, in those aged under six months, 2.14 pg/mL (0.33-8.12 pg/mL),  $p = 0.006$ . The levels of Interferon- $\gamma$  were 115.96 pg/mL (69.27-150.60 pg/mL) in the allergic patients and 97.88 pg/mL (75.30-174.69 pg/mL) in the non-allergic ones ( $p=0.86$ ). The multiple linear regression model for Interleukin-4 and Interferon- $\gamma$  showed that an age of over six months was the factor that contributed to the increase in Interleukin-4 and explained

7% of its variation (adjusted  $r^2 = 0.07$ ;  $p < 0.05$ ). An age of over six months contribute to the increase Interleukin-4 but not to increase Interferon- $\gamma$ .

**Conclusions:** diagnosis of cow's milk protein allergy based on symptoms alone is considerably fallible. This study reaffirms the need to conduct an oral food challenge test to diagnose cow's milk protein allergy in children.

There was no difference between patients with and without the allergy in terms of levels of Interleukin-4 and Interferon - $\gamma$  in peripheral blood.

**Key words** Hypersensitivity to milk, pathological conditions, breast-feeding, preschool children, signs, symptoms, Interferon- $\gamma$ , Interleukin-4.

## Lista de Abreviaturas

---

---

APLV	– Alergia à proteína do leite de vaca
CDC	– Centers of Disease Control and Prevention
Cm	– Centímetro
CNPq	– Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CIC	– <i>Células intersticiais de Cajal</i>
ELISA	– Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
CD4 <sup>+</sup>	– <i>Cluster of differentiation, células T helper</i>
T <sub>H</sub>	– T <i>helper</i>
CD8+	– <i>Cluster of differentiation, células T citolíticas</i>
CD	– <i>Células dendríticas</i>
INF-γ	– <i>Interferon gama</i>
IL-4	– <i>Interleucina quatro</i>
NK-	– <i>Células natural killer</i>
ESPGHAN	– Sociedade Europeia de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica

# Sumário

---

---

1 APRESENTAÇÃO.....	16
Referências .....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 Introdução.....	22
2.2 Tolerância clínica e elementos que contribuem com o fenótipo da criança com PLV .....	25
2.3 Imunidade inata e adaptativa.....	28
2.4 Imunidade adaptativa: papel das citocinas IL4 e INF gama.....	30
2.4.1 O INF $\gamma$ e IL4 em pacientes com APLV .....	32
2.5 Desenvolvimento anátomo-fisiológico pós-natal e sintomas .....	34
2.6 Sintomas e teste de desencadeamento alimentar oral na APLV.....	35
2.7 Considerações finais .....	37
2 Referências .....	38
3 MÉTODOS.....	46
3.1 Aspectos gerais .....	47
3.1.1 Planejamento do estudo.....	47
3.1.2 Local e período .....	47
3.1.3 População .....	47
3.1.4 Estimativa do tamanho amostral .....	48
3.2 Critérios de inclusão e exclusão ao estudo .....	49
3.3 Definição do grupo caso e grupo comparativo.....	49
3.3.1 Grupo caso.....	49
3.3.2 Grupo comparativo.....	49
3.4 Aspectos éticos .....	51
3.5 Operacionalização .....	51
3.5.1 Recrutamento.....	51
3.5.2 Coleta de dados.....	52
3.5.3 Identificação .....	52

3.5.4 Coleta, transporte e armazenamento do sangue.....	52
3.6 Avaliação clínica .....	53
3.7 Avaliação do estado nutricional .....	53
3.8 Laboratório .....	53
3.8.1 Dosagem de IgE total e específicas .....	53
3.8.2 Determinação das citocinas IL-4 e INF-γ.....	54
3.9 Teste desencadeamento alimentar oral .....	56
3.10 Variáveis do estudo .....	57
3.11 Banco de dados .....	59
3.12 Análise estatística .....	59
3.13 Financiamento .....	59
Referências .....	59
<b>4 RESULTADOS - ARTIGO ORIGINAL I</b>	
Teste de desencadeamento alimentar oral na confirmação diagnóstica da alergia à proteína do leite de vaca .....	61
<b>5 RESULTADOS - ARTIGO ORIGINAL II</b>	
Concentração sérica de Interferon $\gamma$ e Interleucina-4 em crianças com suspeita de alergia à proteína do leite de vaca.....	77
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES .....</b>	91
<b>APÊNDICES .....</b>	92
APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	96
APÊNDICE B: Questionário .....	95
ANEXO A: Comitê de Ética em Pesquisa .....	102
ANEXO B: Normas de publicação do artigo I.....	103
ANEXO C:Comprovante da submissão do artigo .....	106

---

# *1 APRESENTAÇÃO*

## ***1 Apresentação***

---

---

A alergia à proteína do leite de vaca (APLV) é uma causa importante de morbidade e, com frequência, representa a primeira manifestação da doença alérgica na infância, possivelmente, porque é a primeira proteína heteróloga consumida no início da vida. Manifesta-se por reações imediatas ou tardias que afetam a pele, trato digestório e respiratório (AHERENS et al, 2008); (BENHAMOUN, 2009); (SICHERER; SAMPSON, 2009). Os sintomas da APLV, em geral, são confundidos com os relacionados a outras situações clínicas em que o sistema imunológico não está envolvido, e o diagnóstico confirmado representa mais ou menos a metade do percentual dos casos suspeitos. (VANDEPLAS et al, 2007). Essa variação reflete os diferentes critérios diagnósticos e desenhos de estudo utilizados pelos pesquisadores em todo o mundo. (BISCHOFF; CROWE, 2005).

A APLV, quase sempre, apresenta-se como um quadro transitório na criança: as macromoléculas antigênicas são absorvidas por via entérica, no intestino delgado, em um período em que muitas funções imunológicas encontram-se, ainda, imaturas. Essa particularidade torna a APLV diferente das demais reações de hipersensibilidade a outras proteínas alimentares, que costumam ocorrer em fases mais tardias, quando o sistema imune está maduro e não reage em todas as ocasiões em que é exposto a antígenos (TURCANU; SOHEILA; LACK, 2003).

Citocinas representam um dos mais numerosos e complexos grupos de moléculas secretadas no organismo e estão envolvidas em múltiplos aspectos da resposta inflamatória alérgica (ABBAS, A K.; LICHTMAN, 2007);( MÜLLER, W, 2007). Seguindo o paradigma  $T_h1$  e  $T_h2$ , os balanceamentos  $T_h1$  (produzindo IL-2, INF $\gamma$  e TNF $\alpha$ ) e  $T_h2$  (produzindo IL4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) implicam uma resposta fisiológica imune, encontrado em indivíduos saudáveis, enquanto o desbalanço entre TH1/Th2 leva a condições dominadas por reações patológicas tardias, mediadas por células, ou por anticorpos. As concentrações dessas citocinas, no sangue periférico e tecidos, têm sido utilizadas em pesquisas para avaliar o

mecanismo imunológico envolvido na alergia à proteína do leite de vaca em crianças (NOMA et al, 1996)

A motivação desta pesquisa surgiu da minha vivência e testemunho, de longa data, das dificuldades em definir o diagnóstico de APLV entre um número, cada vez maior, de crianças encaminhadas, para avaliação e tratamento, com quadros suspeitos de APLV. Muitos já haviam iniciado dietas de isenção, com famílias emocionalmente e financeiramente “ameaçadas” pelo custo das fórmulas especiais. Estimulada por uma ousada vontade de contribuir, de alguma forma, para uma racionalização desses *diagnósticos e tratamentos*, elaboramos um projeto de pesquisa voltado para esses pacientes com suspeita de APLV encaminhados aos ambulatórios de Gastroenterologia Pediátrica.

O estudo que originou esse documento foi planejado e conduzido para responder às seguintes perguntas:

- 1) sintomas relacionados à ingestão do leite de vaca são manifestações de alergia à proteína do leite de vaca?
- 2) os níveis séricos do Interferon- $\gamma$  e da Interleucina -4 diferem entre os pacientes com e sem a alergia às proteínas do leite de vaca?

As hipóteses formuladas foram:

- 1) a suspeita clínica de alergia à proteína do leite de vaca, na maioria das crianças, não é confirmada pelo teste de desencadeamento alimentar oral;
- 2) os níveis séricos do Interferon gama e Interleucina-4 diferem entre os pacientes com e sem alergia à proteína do leite de vaca.

A tese atende aos seguintes objetivos:

- 1) determinar a frequência da alergia à proteína do leite de vaca em crianças com sintomas relacionados à ingestão do leite de vaca;
- 2) determinar as concentrações do Interferon-gama e da Interleucina-4 em pacientes com e sem alergia à proteína do leite de vaca.

A tese está apresentada na forma de um capítulo de revisão da literatura, um capítulo de método e de dois artigos originais.

O capítulo de revisão da literatura foi estruturado para abranger os aspectos da história natural, da patogenia, com destaque para as atividades da resposta inflamatória mediada pelo Interferon- $\gamma$  e Interleucina-4, e aspectos das principais manifestações clínicas para

fundamentar a discussão dos dados empíricos encontrados na pesquisa. Foram realizadas buscas nas seguintes bases de dados: Pubmed, Medline, Embase, Lilacs, Web of Science, Periódicos Capes, Cochrane Library. Foram usadas as seguintes palavras-chave: alergia, proteína do leite de vaca, crianças, interferon-gama, interleucina-4, tolerância oral.

O capítulo de método descreve o planejamento, a operacionalização do estudo, o plano de análise dos que originaram os dois artigos apresentados.

O primeiro artigo foi construído a partir do primeiro objetivo da pesquisa, submetido ao *Jornal de Pediatria (Rio. J)*, e se intitula: “*Teste de desencadeamento alimentar oral na confirmação diagnóstica na alergia à proteína do leite de vaca em crianças.*” Esse artigo se fundamenta nos dados obtidos na primeira fase do estudo elaborado para definição dos grupos de pacientes com e sem alergia à proteína do leite de vaca. O principal resultado foi que a confirmação diagnóstica da APLV pelo teste de desencadeamento alimentar oral não ocorreu em mais da metade da população estudada. Esse resultado gerou uma discussão sobre alguns aspectos do desenvolvimento anatômico e funcional da criança, no início da vida, para explicar os sintomas relatados pelas famílias e pediatras. Confirma a importância do teste de desencadeamento oral para definição diagnóstica e sugere algumas alternativas para minimizar condutas equivocadas diante das crianças nas manifestações clínicas atribuídas à ingestão do leite de vaca.

O segundo artigo intitulado ”*Concentração de Interferon gama e Interleucina-4 em crianças com suspeita de alergia à proteína do leite de vaca*” foi planejado a partir do segundo objetivo da pesquisa. Foram aferidas e comparadas, no sangue periférico, as concentrações de Interferon-γ e Interleucina-4 de sessenta e quatro crianças com suspeita de alergia à proteína do leite de vaca. A aferição dessas citocinas foi realizada antes do estabelecimento do diagnóstico pelo teste de desencadeamento alimentar oral. Os resultados obtidos permitiram uma discussão sobre peculiaridades imunológicas na aquisição da tolerância à proteína do leite de vaca, e os elementos que contribuem para a perda dessa tolerância.

Esta tese se destina à obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente pela Aluna Maria das Graças Moura Lins e foi orientada pela Professora Dra. Maria Eugênia Farias Almeida Motta e está incluída na Linha de pesquisa Afecções

gastrointestinais: clínica e epidemiologia do Grupo de Pesquisa em “Gastroenterologia e Nutrição” da UFPE. Este estudo recebeu financiamento do CNPq, por meio do Edital Universal de 2006.

## Referências

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Básica**. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2007.
- ABRAHAM, C. M.; OWNB, D. R. Ontogeny of the allergic inflammatory response. **Immunol Allergy Clin North Am.**, v. 25, n. 2, p. 215-29, 2005.
- AHERENS B. et al. Differential diagnosis of food-induced symptoms. **Pediatr Allergy Immunol.**, v. 19, p. 92-96, 2008.
- BENHAMOUN, A.H. An overview of cow's milk allergy in children. **Swiss Med Wkly**; Genève 139, v. 21-22, 300-307, 2009.
- BINDASLEV-JENSEN, C. et al. Standardization of food and Immunology in patients with immediate reactions to foods- positions paper from the European Academy of Allergy. **Allergy**, v. 59, p. 690-7, 2004.
- BISCHOFF S.; CROWE, S.E. Gastrointestinal Food Allergy: New Insights into Pathophysiology and Clinical Perspectives. **Gastroenterology**, v. 128, n. 4, 1089-1113, 2005.
- CALDER, P.C. et al. Early nutrition and immunity – progress and perspectives. **Br J Nutr.**, v. 96, n. 4, p. 774-9, 2006.
- GUPTA, R.S. et al. Food allergy knowledge, attitudes and beliefs: focus groups of parents, physicians and general public. **BMC Pediatrics**, Chicago, v.8 p. 36, set, 2008. Disponível em <<http://www.biomedcentral.com/471-2431/836>.
- KROGULSKA, A. et al. Citokines profiles in children's with asthma Undergoing food challenges **J Investing Allegro Immunol.** , v. 10, n. 1, p. 43-48, 2009.

MÜLLER, W. Dissecting the cytokine net work. **Cellular Immunology**, v. 244, p. 162-164, apr. /2007.

NIGGEMANN, B; BEYER, K. Diagnosis of food allergy in children: Toward standardizations of food challenge **JPGN**, v. 45, p. 399-404, 2007.

\_\_\_\_\_. Pitfalls in double-blind, placebo controlled oral food challenges. **Allergy**, v.62, p.729-732, 2007.

NOWAK-WEGRZYN; A.; SAMPSON, H.A. Food allergy. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 17, n. 2, p. 470-75, 2006. Supplement.

NOMA, T. et al. Cytokine production in children outgrowing hen egg allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 26, p. 1298-1307, jun., 1996.

PAAJANEN, L. et al. Increased INF- $\gamma$  secretion from duodenal biopsy samples in delayed-type cow's milk allergy. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 16, p. 439-444, 2005.

PEREZ-MACHADO, M. A. et al. Spontaneous Th1 cytokine production by intraepitelial but not circulating cells in infants with and without food allergies. **Allergy**, v.59, p. 346-353, 2004.

SICHERER, S.H.; SAMPSON, H.A. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. **Annu, Rev. Med.**, V. 60, p. 261-77 New York 2009. Disponível em: <<http://med.anualreviews.org>>. Acesso em: 09/06/2009.

TURCANU, V.; SOHEILA, J. M.; LACK, G. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. **J. Clin invest.**, v. 111, 1065-1072, 2003.

VANDERPLAS, Y. et al. Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. **Arch. Dis. Child.** 92: 902-908, 2007. Disponível em: <<http://adc.bmjjournals.com>>. Acesso em 11 jun. 2009.

VILLAGE-BOESTRA, B. J. et al. Placebo reactions in double-blind, placebo controlled food challenges in children. **Allergy**; v. 62, 905-912, 2007.

WALKER-SMITH, J. Cow's milkallergy: a new understanding from immunology. **Ann Allergy Asthma Immunol.** 90, n. 13, p. 81-83, 2003. Supplement.

## *2 REVISÃO DA LITERATURA*

---

## 2 *REVISÃO DA LITERATURA*

---

### 2.1 Introdução

A alergia à proteína do leite de vaca (APLV) é, em geral, a primeira reação de hipersensibilidade imunologicamente mediada na infância (SAMPSON, 1999); (SICHERER, 2002); (BISHCHOFF; CROWE, 2005); (SICHERER; SAMPSON, 2006.); (NOWAK-WEGRSYN; SAMPSON, 2006); (SICHERER; SAMPSON, 2009); (BOYCE et al, 2009); (BENHAMOUN, 2009). As manifestações iniciadas em minutos a poucas horas após a ingestão, ditas imediatas, são de fácil identificação mas, quando se apresentam como síndromes crônicas, que surgem muitas horas e até dias após a ingestão do leite, é mais difícil identificar se há mecanismos imunológicos envolvidos. Um número crescente de pacientes (8%-15%) em todo mundo são encaminhados aos ambulatórios de Pediatria e especializados (Gastroenterologia, Dermatologia e Alergia), com quadros suspeitos de APLV mas, o diagnóstico só é confirmado em 2% a 8% dos casos (AARDOOM et al, 1997); (ZUBERBIER et al, 2004); (MURCH, 2005); (RONA et al, 2007); (VANDERPLAS et al, 2009).

A perda da sensibilidade à proteína do leite de vaca ocorre de maneira progressiva, com o avançar da idade: 50% até um ano, 70% até os dois anos e 85% até os três anos, diferente do que é observado em relação a outros抗ígenos alimentares. Segundo o modelo atual para a doença alérgica, centralizado no papel da IgE, o Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) age como um fator limitante das reações do tipo imediata, induzindo diminuição da produção e das concentrações de interleucina-4 (IL-4). Mas o aumento da produção e concentrações de INF $\gamma$  pode representar tanto a evolução para a tolerância oral como caracterizar as reações do tipo tardias (ABBAS, 2007).

O valor dos sintomas em crianças pequenas depende da interpretação a eles atribuída pelas famílias e da habilidade do pediatra em diferenciar as manifestações causadas por hipersensibilidade daquelas relacionadas a outras condições fisiológicas ou patológicas que ocorrem nesse período da vida (GUPTA, 2008); (EGGESBO, 1999, 2001); (VENTER et al, 2006, 2008). Uma avaliação crítica das informações obtidas na anamnese e análise criteriosa do provável mecanismo envolvido devem preceder as solicitações de exames laboratoriais e

estabelecimento de condutas (AHRENS et al, 2008); (SOLÉ et al, 2008); (COX; HUSBY, 2008); ( KEMP et al, 2008).

A revisão a seguir embasou a pesquisa "*Alergia à proteína do leite de vaca em crianças: análise clínica e concentrações de Interferon-γ e Interleucina - 4*". Aborda aspectos do desenvolvimento da tolerância através dos períodos pré e pós-natal e elementos que contribuem para a expressão do fenótipo alérgico, com enfoque nos mecanismos imunológicos representados pela IL-4 e interferon-gama e analisa o diagnóstico da APLV baseado em sintomas.

Foram revisados artigos indexados nas fontes de informação em ciências da saúde: LILACS, MEDLINE, Biblioteca Cochrane, utilizando o banco de dados da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) da BIREME-OPAS-OMS e do SciELO, no período de 1980 até 2010. Os descritores e o enfoque dos estudos em cada item da revisão estão listados no quadro 1.

**Quadro 1 – Descritores e enfoque dos estudos utilizados na revisão**

Aspectos da revisão	Descritores	Enfoque dos estudos
<b>Alergia à proteína do leite de vaca (APLV)</b>	Alergia à proteína do leite vaca, prevalência, criança	Estudos abordando a distribuição intollerância da APLV.
<b>Tolerância clínica ao leite de vaca e fenótipo da criança com APLV</b>	Tolerância oral, desenvolvimento imunológico, criança	Estudos que abordam os elementos que interferem na manutenção da tolerância e expressão do fenótipo das crianças com APLV.
<b>Imunidade inata e adaptativa</b>	Ontogenia, sistema imunológico imunidade, criança	Estudos abordando o desenvolvimento do sistema imune
<b>Citocinas</b>	Citocina	Papel das citocinas nas reações inflamatórias alérgicas
<b>Interferon-gama (INF<math>\gamma</math>) e interleucina-4(IL-4) crianças com APLV</b>	Interleucina-4 e INF- $\gamma$ , crianças, alergia à proteína do leite de vaca	Bases empíricas da resposta inflamatória alergia e expressão das citocinas IL-4 e INF $\gamma$
<b>Desenvolvimento anatômico e fisiológico da criança no período pós-natal e sintomas de APLV</b>	Hipersensibilidade a leite; condições patológicas, sinais e sintomas; lactente; pré-escolar.	Estudos abordando sinais e sintomas da criança com APLV. Aspectos do desenvolvimento anatômico e funcional na expressão dos sintomas
<b>Teste de desencadeamento alimentar oral na APLV</b>	Teste de desencadeamento alimentar oral, teste de provocação oral, alergia à proteína do leite de vaca	Estudos abordando o teste de desencadeamento alimentar oral para APLV, métodos e resultados

## 2.2 Tolerância clínica e elementos que contribuem com o fenótipo da criança com APLV

Desde o início da vida, as respostas imunes inatas se organizam para assegurar a integridade do organismo aos enfrentamentos ambientais. Mas, em indivíduos geneticamente predispostos, vários elementos contribuem para uma descontinuidade desse processo de tolerância e propiciam a expressão do fenótipo da criança alérgica. (CALDER, 2006).

A exposição intrauterina a alérgenos, documentadas por antígenos no sangue do cordão umbilical e líquido amniótico, coloca a sensibilização pré-natal como uma possibilidade teórica. Profundas mudanças imunológicas ocorrem no organismo materno durante a gestação. Essas mudanças envolvem, entre outros mecanismos, a polarização das células T *helper* ( $T_h$ ) em direção ao perfil  $T_h2$  e células T reguladoras ( $T_{reg}$ ). Tal fenômeno é importante para manter a gestação e evitar rejeição de fetos imunologicamente incompatíveis (PRESCOTT et al, 1998) (RAGHUPHTY, 2001). O sistema imunológico fetal responde com essa mesma polarização (PRESCOTT et al, 1999). Células CD4+ e CD8+ podem ser detectadas no feto com 20 semanas e no terceiro trimestre de gestação já é possível verificar respostas específicas a antígenos pelas células T (ABRAHN; OWNBY, 2005).

As respostas imunológicas ao nascimento parecem ser um caminho natural para o desenvolvimento da tolerância oral, principalmente para antígenos presentes nos alimentos. Se, nesse período, o sistema imune for incapaz de contrarregular a dominância pré-existente  $Th2$ , o fenótipo alérgico poderá então desenvolver-se (PERON, 2009).

Células fetais são capazes de produzir IgE a partir do segundo semestre de gestação; IgE específicas e células T de memória no sangue do cordão umbilical têm sido reportadas como fatores preditivos de atopia (JONES, 2000); (PROKESOVA et al, 2006). Esse conceito de sensibilização intrauterina pautou recomendações de dietas de exclusão durante a gravidez, mas os efeitos sobre a sensibilização na infância não foi demonstrado. Estudo mais recente concluiu que a IgE específica no cordão umbilical parece ser o resultado de transferência de IgE materna para o feto (KLAUS et al, 2008).

A microbiota do recém-nascido desenvolve-se rapidamente após o nascimento e depende fortemente da microbiota materna, do tipo de parto e ambiente de nascimento. O parto cesáreo influencia negativamente o estabelecimento da microbiota e, por consequência, o equilíbrio imunofisiológico intestinal. Crianças nascidas de parto cesáreo, com um mês de vida, apresentam menor número de bifidobactérias e *Bacteroides* e são colonizadas, com mais frequência, pelo *Clostridium difficile*, quando comparado com as crianças nascidas de parto vaginal. (PENDERS; THIJS; VINK et al, 2006). Diferenças na microbiota dessas crianças, em relação ao tipo de parto, foram constatadas também aos seis meses de idade e o tipo de microbiota esteve associado à maturação de mecanismos imunológicos (GROLUND et al,

1999, 2000). Nesse período, os mecanismos envolvidos na tolerância oral se desenvolvem principalmente em resposta à microbiota intestinal e à ativação de receptores específicos Toll-like sobre as células regulatórias. (WALKER-SMITH, 1999). A manipulação da microbiota influencia a colonização subsequente e expressão de citocinas, pela modificação da microecologia (RAUTAVA; KALLIOMÄKI; ISOLAURI, 2002) (KALLIOMÄC, 2001, 2009); (ISHIKWA et al, 2008).

Os抗ígenos alimentares são absorvidos pelos enterócitos por endocitose (não seletiva e mediada por receptor) e através das junções intercelulares. Esses dois mecanismos são conhecidos como processos residuais imaturos de absorção e são tanto mais intensos quanto mais jovem é o indivíduo (KODA; BARBIERI, 1994). A zona juncional firme também se encontra pouco desenvolvida ao nascimento, principalmente no prematuro, e possibilita a passagem de macromoléculas pelos poros intercelulares. Lesões ou inflamações na superfície do epitélio intestinal em situações patológicas, como na alergia a proteínas do leite de vaca, aumentam também a permeabilidade intestinal. Mesmo em condições normais, há um pequeno transporte de macromoléculas intactas através das mucosas, aproximadamente 2% dos抗ígenos alimentares em adultos. Isso significa que o trato intestinal não é uma barreira impenetrável, mesmo na maturidade.

Quando administrados pela via oral, os抗ígenos ganham rapidamente acesso à mucosa e a tecidos linfóides. Células reguladoras têm sido demonstradas nas placas de Peyer e, dentro dos linfonodos mesentéricos, 24 horas após uma única ingestão do抗ígeno e, no baço, entre cinco a sete dias. A supressão específica após a exposição é demonstrável após 48 horas (STROBEL; MOWAT, 2006), mas, nas reações de hipersensibilidade do tipo tardio, pode ser alcançada apenas em 17 meses após uma única ingestão. Embora a supressão de respostas de anticorpos tenha menor duração e se perca após 3- 6 meses (STROBEL; MOWAT, 1998, 2006); (BISCHOFF, S; CROWE, S. E. 2005).

O aleitamento materno constitui um verdadeiro escudo imunológico nos primeiros meses de vida e tem papel imunomodulador quando da introdução dos novos alimentos da dieta complementar. Portanto, o desmame precoce e a introdução de proteínas estranhas, de elevado potencial imunogênico, como as do leite de vaca, representa um potente estímulo antigênico para a mucosa imatura e permeável (UDALL et al, 1981). A presença desses抗ígenos no lúmen intestinal afeta diretamente a microbiota e o início das respostas imunológicas pelas células dendríticas, em seu importante papel sinalizador na direção à diferenciação de células Th para Th1, Th2 ou Treg.

Simultaneamente ou em sequência, ações preventivas como aplicações de vacinas, infecções, bacterianas ou virais, comuns nos primeiros meses de vida, ações terapêuticas, como uso de antimicrobianos ou com intenções curativas, como ocorre no tratamento da doença do refluxo, com inibidores de bombas de prótons, são outros itens que interferem no reconhecimento, eliminação, formação de memórias, e no estabelecimento da modulação adequada e mantida da resposta imune frente aos gatilhos ambientais (CALDER, 2006). (figura 2)

As respostas vacinas-específicas e a produção de citocinas foram recentemente verificadas em uma série de experimentos (RYKÖNEN et al, 2004); (BIGGELAAR, 2009) e, coletivamente, os estudos sugerem uma hiporesponsividade das respostas adaptativas durante os primeiros seis a doze meses de vida com aumento da produção de INF- $\gamma$  em fases mais tardias da vida, como parte do imunofenótipo do paciente atópico.

O fato de as crianças com APLV, na maioria dos casos, terem uma evolução favorável para tolerância até o terceiro ano de vida é uma peculiaridade que sinaliza para uma observação diferenciada da criança com reações de hipersensibilidade relacionadas à ingestão do leite de vaca, em relação às dirigidas a outros抗ígenos alimentares, que costumam perdurar até a idade adulta. Talvez a imunidade inata seja um elo primordial entre tantas variáveis (BEYER; TEUBER, 2004).

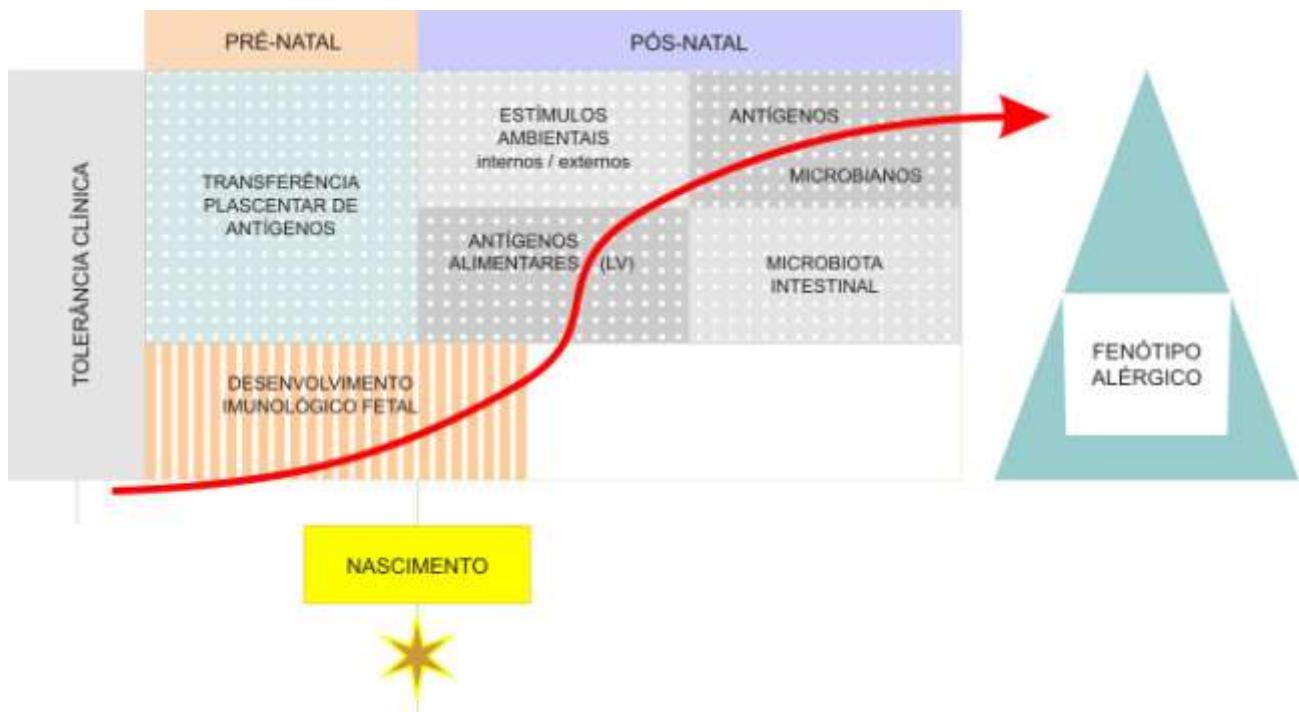


Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento da tolerância clínica através do período pré e pós-natal e elementos que contribuem para a expressão do fenótipo alérgico

Fonte: Calder et AL British Journal of Nutrition 2006, 96, 774-790

### 2.3 Imunidade inata e adaptativa

Os elementos do sistema imune inato distinguem, precisamente, entre o que é próprio do organismo e os patógenos; entretanto, eles não conseguem distinguir as pequenas diferenças das moléculas estranhas. A imunidade adaptativa desenvolve-se em resposta a um agente infeccioso ou antígeno, reconhece, elimina ou relembra o agente agressor. Fornece uma segunda e completa linha de defesas que elimina os patógenos que escapam da ação da imunidade inata ou que persistem apesar dela. Se um mesmo agente ou outro intimamente relacionado afeta o organismo, as células de memória fornecem os mecanismos para o sistema adaptativo fazer um ataque rápido e efetivo para eliminá-los. (ABBAS, 2007).

O sistema imune inato e adaptativo do recém-nascido e crianças menores mostram diferenças quantitativas e funcionais em relação ao do adulto, podendo influenciar, significativamente, o desenvolvimento da doença alérgica, segundo o genótipo, perfil de citocinas, tipos de alérgenos e via de acesso desses ao sistema imunológico (MAYER et al, 2001); (CORREA; ZULLIANI, 2001).

O sistema imunológico inato atua pelo menos para seis funções controladoras da homeostase da mucosa intestinal: 1) preservação da barreira, 2) inibição da apoptose tecidual e inflamação, 3) aceleração da reparação tecidual, 4) exclusão de patógenos por autofagia e outras defesas antimicrobianas, 5) manutenção da imunotolerância aos comensais, e 6)

ligações com a imunidade adaptativa. De fato, o sistema imune inato não age separadamente, mas os dois sistemas interagem produtivamente e sinergicamente. A ativação do sistema inato sinaliza para o epitélio da mucosa intestinal modular a resposta adaptativa através de ordens imunorreguladoras. Células dendríticas residentes ou infiltradas, células T e células B amplificam o reconhecimento do antígeno e liberam a produção de anticorpos promovendo a resposta inflamatória protetora. (ABBAS, 2007); (TEITELBAUM; WALKER, 2005).

Existem duas subpopulações bem definidas de células T: as células T auxiliares ( $T_H$ ) e as células citotóxicas ( $T_C$ ); recentemente uma terceira subpopulação foi caracterizada, as células T reguladoras ( $T_{reg}$ ). As células T auxiliares e as células T citotóxicas podem ser distinguidas uma das outras pela presença das glicoproteínas de membrana CD4 e CD8. Na sua superfície. As células CD4 geralmente atuam como células  $T_H$  enquanto aquelas que apresentam CD8 geralmente atuam como células  $T_C$ . Assim, a proporção de células  $T_H$  para células  $T_C$  em uma amostra pode ser determinada, aproximadamente, pelo número de células  $CD4^+$  e  $CD8^+$ . Esta proporção é de cerca de 1:2 no sangue periférico humano normal, mas pode estar significativamente alterada por doenças autoimunes e outras disfunções (KINDT, 2007). Após a ativação pela interação com complexos antígeno - MHC, as células  $T_H$  diferenciam-se em células efetoras que permitem ou auxiliam a ativação de células B, células  $T_C$ , macrófagos e diversos outros tipos de células que participam da resposta imune. Alternativamente, algumas células  $T_H$  diferenciam-se em células de memória em vez de células efetoras (EIGENMANN; FROSSARD, 2003).

Os linfócitos  $CD4^+/CD8^+$  são qualitativamente funcionais e quantitativamente elevados ao nascimento, declinando em número até o sexto mês de idade. Na presença de antígenos, as células T não ativadas são substituídas, progressivamente, por células T ativadas ou de memória, denominadas  $T_{h0}$ , que agem sobre a regulação e proliferação de linfócitos T e B das respostas adaptativas. É essencial que a ativação das próprias células Th seja cuidadosamente regulada, porque a resposta de uma célula T direcionada contra seus próprios componentes pode ter consequências autoimunes fatais. Uma garantia contra a ativação descontrolada das células Th é que os receptores podem reconhecer somente um antígeno apresentado junto às moléculas do MHC de classe II na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs). Essas células especializadas, incluindo os macrófagos, os linfócitos B e as células dendríticas, são distinguidas por duas propriedades: 1) expressam as moléculas MHC de classe II nas suas membranas e 2) produzem citocinas (EIGENMANN; FROSSARD, 2003).

## 2.4 Imunidade adaptativa: papel das citocinas IL4 e INF- $\gamma$

As citocinas representam um dos mais numerosos e complexos grupos de moléculas secretadas no organismo. Estão envolvidas em múltiplos aspectos da resposta inflamatória intestinal. Exibem os atributos de pleiotropia, redundância, sinergia, antagonismo e indução da cascata de sinalização, os quais permitem que ela regule a atividade celular de uma maneira coordenada e interativa. A citocina que apresenta efeitos biológicos em diferentes células-alvo exibe uma ação pleiotrópica. Duas ou mais citocinas que medeiam funções similares são consideradas redundantes, característica que dificulta a descrição de uma atividade particular para uma única citocina. O sinergismo das citocinas ocorre quando o efeito combinado de duas citocinas na atividade celular é maior do que os efeitos aditivos das citocinas individualmente. Em alguns casos, citocinas exibem antagonismo, que é o fato de uma citocina anular ou inibir o efeito de outra citocina. A indução em cascata ocorre quando a ação de uma citocina em uma célula-alvo induz a célula a produzir uma ou mais citocinas, as quais podem induzir novas células alvo a produzir outras citocinas. (KINDT et al, 2007). Por essas propriedades, a classificação de citocinas é sempre arbitrária.

É praticamente impossível agrupar citocinas, com precisão, de acordo com uma única fonte produtora ou por suas atividades. A compreensão da atividade biológica da rede de citocinas é uma tarefa muito complexa, mesmo com os recentes avanços de utilização bioinformática. A exemplo do INF tipo e I e tipo II, citocinas aparentemente não relacionadas, no nível de suas proteínas e de receptores estruturais, apresentam, parcialmente, atividades biológicas semelhantes (WERNER MULLER, 2007).

Mas algumas classificações foram feitas segundo características comuns para facilitar o entendimento e o papel individual no trato gastrintestinal. Uma dela é restrita às citocinas produzidas pelas células CD4+ células T<sub>H</sub>, seguindo o paradigma T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2. De acordo com esse conceito, o balanceamento T<sub>H</sub>1 (produzindo IL-2, INF $\gamma$  e TNF $\alpha$ ) e T<sub>H</sub>2 (produzindo IL4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) implica uma resposta fisiológica imune, encontrada em indivíduos saudáveis, enquanto o desbalanço entre T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 refere-se a condições dominadas por reações patológicas tardias, mediadas por célula ou por anticorpos (REINER, 2001).

A citocina mais importante produzida pelas células T<sub>H</sub>1 é o interferon gama (INF $\gamma$ ). Enquanto as células T<sub>H</sub>2 produzem interleucina quatro (IL-4), que estimula a produção de IgE e IL-5, ativam eosinófilos, portanto, estimulam também a imunidade independente dos fagócitos mediada por eosinófilos. Citocinas produzidas por células T<sub>H</sub>2 inibem a ativação dos macrófagos e suprimem a imunidade mediada pelas células T<sub>H</sub>1. Mas é provável que muitas

células T CD4+ diferenciadas produzam várias combinações de citocinas, estimulem diversos mecanismos efetores e não possam ser facilmente classificadas em subpopulações  $T_h1$  e  $T_h2$  (ABBAS, 2007); (KINDT, 2007).

A IL-4 foi originalmente identificada como um fator de crescimento de célula B. Além do linfócito T, a IL-4 pode ser derivada de célula T citotóxica, mastócitos e basófilos. A IL-4 é produzida por linfócitos  $T_h2$  e por células da medula óssea, estimula a ativação e a divisão dos linfócitos B, além de promover a mudança de classe de imunoglobulinas para IgG1 e IgE (ABBAS, 2007); (KINDT, 2007). Estudos experimentais utilizando ratos geneticamente modificados, sem o gen IL-4 (*knockouts*), são incapazes de sintetizar IgE. Em contraste, os ratos modificados para produzirem IL-4, excessivamente, tiveram elevados níveis de IgE sérica (SUDO et al, 1997).

A IL-4 induz a síntese de IgE pelas células B, e a capacidade de clones de células T manter a produção de IgE é diretamente proporcional à produção de IL-4. Outra atividade importante da IL-4 na inflamação alérgica é a habilidade de induzir a expressão da molécula I de adesão das células vasculares sobre as células endoteliais. Facilita a adesão ao endotélio por células T como eosinófilos, basófilos e monócitos, característica das reações alérgicas (KINDT, 2007).

O interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), também conhecido como interferon tipo II ou interferon imune, é uma citocina produzida primariamente pelos linfócitos T e células *natural killer* (NK) e não compartilha homologia significante com IFN- $\beta$  e com várias proteínas da INF- $\alpha$  (WERNER MULLER, 2007). O IFN- $\gamma$  humano é essencialmente espécie-específica e é biologicamente ativo apenas em células humanas de primatas. Originalmente caracterizado com base em suas atividades antivirais, o INF- $\gamma$  tem funções antiproliferativas, imunorreguladoras e pró-inflamatórias importantes nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Induz a produção de citocinas e aumenta a regulação da expressão do MHC classe I, receptor Fc e leucócitos de adesão de moléculas. Modula as funções efetoras dos macrófagos, influencia a mudança do isótipo e potencia a secreção de imunoglobulinas pelas células. O IFN- $\gamma$  também aumenta a expansão das células T e pode ser requisitado para a diferenciação das células T auxiliares (GADINA, 2001).

O IFN- $\gamma$  exerce suas atividades biológicas pela ligação a receptores específicos da superfície celular com alta afinidade em locais de ligação. Os receptores de IFN- $\gamma$  estão presentes em quase todos os tipos de células (exceto em eritrócitos maduros) e tem sido clonado. O receptor de IFN- $\gamma$  é estruturalmente relacionado ao receptor de IL-10. Portanto, a citocina mais importante responsável pela imunidade mediada por células é o INF- $\gamma$ , como

um inibidor da resposta alérgica pela capacidade de inibir o efeito mediado pela IL-4 sobre as células B, inibindo a secreção de IgE e exprimindo a baixa afinidade dos receptores de IgE. Em resumo, a produção de IgE representa a combinação da excessiva produção de IL-4 e IL-13 na relativa ausência de INF- $\gamma$  (KINDT, 2007).

O papel das citocinas na alergia alimentar entrou em evidência nas últimas duas décadas e os resultados dos estudos, ainda que com vários pontos divergentes, acenam para a utilidade de suas concentrações, teciduais e plasmáticas, no entendimento da natureza e previsão das reações de hipersensibilidade (KROGULSKA, 2009).

Diferenças entre a produção e função de citocinas com perfil Th1 e Th2 têm sido documentadas em recém-nascidos e adultos e a definição de um perfil imunológico capaz de identificar o que ocorre no microambiente e expresso por sintomas atribuíveis à APLV tem sido objeto de um número grande de investigações. As populações estudadas, entretanto, não são homogêneas quanto à faixa etária, duração e características dos sintomas (MACKDONALD; SPENCER, 1996); (HAUER et al, 1997) (BENLOUNES et al, 1999); (BARTUZI et al, 2000), (BLOCK, 2000), (JARVINEN et al, 2002) (VERES et al, 2003); (TURCANU; SOHEILA; LACK, 2003); (PEREZ-MACHADO et al, 2004); (MARCIOROWSKA; PANASIUK; KACSMARSKI, 2005); (PAAJANEN et al, 2005); (THOTTINGAL et al, 2006).

#### *2.4.1 O INF- $\gamma$ e IL-4 em pacientes com APLV*

Nos estudos de Hill (HILL, 1989, 1993), nenhuma mudança consistente foi determinada em crianças com APLV, a despeito da aquisição da tolerância e, na época, levantou-se a hipótese de que a remissão dos sintomas atribuíveis a reações alérgicas não devam ser atribuídas apenas a eventos imunológicos (HILL, 1989). Uma menor produção do INF- $\gamma$  entre os pacientes com reações do tipo imediata ao leite de vaca foi considerada como um reforço ao envolvimento dessa citocina na imunopatogênese das reações tardias, mas sem utilidade clínica como teste diagnóstico (HILL, 1993). Outras pesquisas subsequentes demonstraram associação do perfil de citocinas com a especificidade e grau das reações de hipersensibilidade às proteínas do leite de vaca e de outras proteínas alimentares (MACKDONALD; SPENCER, 1996). Belounes e Jong demonstraram que os linfócitos T do sangue periférico (alérgenos específicos) são T<sub>h</sub>2 e produzem IL-4 e IL-5 com ações reguladoras na liberação de anticorpos IgE *in vivo e in vitro* (BENLOUNES et al, 1996); (BENLOUNES et al, 1999).

A liberação de citocinas e mediadores inflamatórios aumentam a degradação da barreira epitelial, levando ao ciclo vicioso inflamatório. Seguiram-se relatos sobre a remissão da alergia a ovo, por um grupo japonês, e indicação do mecanismo através da determinação de IL-4 e INF $\gamma$ , em células mononucleares do sangue periférico, de pré-escolares com dermatite atópica pela ovoalbúmina (NOMA, 1996). Nesse experimento verificou-se que a produção de INF $\gamma$  derivada de pacientes que haviam desenvolvido tolerância a ovoalbumina era capaz de inibir a produção de IL-4 de pacientes com doença ativa, que por sua vez, era capaz de inibir a produção de INF $\gamma$ , demonstrando ser a produção antigênica dessas citocinas reciprocamente reguladas. Entretanto, a produção de IL-4 e INF- $\gamma$ , em pacientes com quadro moderado de dermatite atópica, equivaleu à dos controles sadios, semelhante ao observado em estudo anterior (TANG et al, 1993). Os autores admitiram que uma análise dessas citocinas, antes e após a remissão dos sintomas, seria necessária para verificar esse fenômeno. O experimento remete, mais uma vez, à importância do tempo para representação desses mediadores nas reações alérgicas.

A expressão de citocinas, adesão de moléculas, ativação e proliferação também foram estudadas em biópsias duodenais de crianças com alergia alimentar, de reação tardia, tratadas e não tratadas em comparação com crianças sem alergia alimentar. Demonstrou-se que, mesmo com estrutura vilositária preservada, as células da lâmina própria expressam INF- $\gamma$ , indicando uma resposta do tipo Th1. Sugere, assim, que o desequilíbrio de citocinas deve ter importante função nas reações tardias na alergia alimentar (BLOCK, 2000). Mas, a despeito da preservação morfológica das vilosidades intestinais, um aumento do INF- $\gamma$  foi descrito em crianças com alergia alimentar, indicando uma resposta Th1 (VERES et al, 2003).

Linfócitos intraepiteliais duodenais de crianças exibem um estado espontâneo de crescente ativação a respostas do tipo Th1 e nas reações alérgicas às proteínas do amendoim, leite e ovo em crianças: foram predominantes as citocinas IL4, IL-5 e IL-13, em contraste com INF- $\gamma$  e TNF $\alpha$  naquelas não alérgicas ou que adquiriram tolerância. (TURCANU; SOHEILA; LACK, 2003). A concentração de citocinas em mucosa gástrica de crianças com alergia alimentar e portadores de infecção pelo *Helicobacter pylori* (*Hp*) diferiu,显著mente, quanto aos níveis de INF- $\gamma$ , IL-2, IL-8 e TNF $\alpha$ , quando comparada aos com *Hp* sem alergia alimentar (MARCIOROWSKA; PANASIUK; KACSMARSKI, 2005).

O padrão da produção de citocinas foi determinado em sangue periférico, em 22 crianças alérgicas e 20 controles por citometria de fluxo, e demonstrou, em crianças com alergia alimentar que a resposta de IL-4 ocorreu predominantemente pela memória da população de células CD4+, CD45 e RO+, enquanto IL-4 e INF- $\gamma$  nos controles, sem alergia

alimentar, foram, predominantemente, um mix da população de células CD4+ CD8+ m CD45 RO+ (SCOTT-TAYLOR et al, 2005.)

O comportamento das citocinas  $T_{H1}/T_{H2}$  foi investigado em indivíduos adultos, alérgicos, não alérgicos e que já haviam desenvolvido a tolerância ao amendoim. O padrão  $T_{H1}$  pelo INF $\gamma$ , indicativo de proteção, foi semelhante nos três grupos, independente da expressão clínica; enquanto contrário, o padrão Th2 diferenciou-se de acordo com a condição alérgica. (THOTTINGAL et al, 2006). Baixa produção de IL-4 TGF- $\beta$  e IL-2 foi demonstrada em pacientes alérgicos e grupos controles com reações mediadas por células (JYONOUCHI, 2005).

Em crianças com APLV, linfócitos da mucosa duodenal produziram citocinas Th2 em baixas concentrações de TGF- $\beta$  e IL-10, sugerindo falha na indução da tolerância oral, porém nenhum grupo controle foi incluído nessa análise por dificuldades técnicas (BEYER; CASTRO; BIRNBAUN, 2002). Estudo subsequente com grupo controle, nenhuma diferença na produção de citocinas Th2 ou Th1 foi encontrada nos linfócitos da mucosa duodenal de crianças com alergia a múltiplas proteínas. Entretanto, uma reduzida produção de TGF- $\beta$ , pelos linfócitos T da mucosa duodenal, foi demonstrada nos pacientes sintomáticos em comparação ao sem diagnóstico de alergia. (PEREZ-MACHADO et al, 2003). Crianças que alcançaram tolerância de alergia não IgE mediadas apresentaram maior número de células T CD4+ CD2+ que ainda estavam com sintomas de alergia ao leite de vaca. A tolerância oral ao leite de vaca foi associada à diminuição de respostas proliferativas à  $\beta$ -lactoglobulina (KARLSON; RUGTVEIG; BRADTZAEG, 2004).

Esses estudos indicam que a função adequada regulatória das células T é importante para a indução e manutenção da tolerância oral em seres humanos, mas a questão do paradigma  $Th1/ Th2$ , como indicativo do processo imunológico envolvido na alergia alimentar, continua controverso em sua aplicabilidade clínica, principalmente no que se refere a crianças com APLV. Todo esse processo é influenciado por circunstâncias do desenvolvimento, fisiológicas ou patológicas de cada indivíduo.

## 2.5 Desenvolvimento anátomo-fisiológico pós-natal e sintomas

O processo de desenvolvimentos anatômico e funcional do organismo compreende um grande número de elementos, desde a embriogênese à vida pós-natal precoce; depende de inúmeras interações entre diferentes sistemas sinalizadores intercelulares e pode ser modificado, em seu equilíbrio, em qualquer momento (CHEHADE; MAYER, 2005).

Respostas inadequadas a estímulos ambientais, no início da vida, expressam-se por sinais e sintomas que nem sempre representam a presença de uma doença, mas refletem o grau de maturidade orgânica (GRUNDY, 2005); (ISSENMAN et al, 2002). Algumas evidências sugerem que essas manifestações decorrem de mudanças comportamentais nos cuidados dispensados à criança na vida moderna, algumas ditadas por prescrições médicas como: suplementação alimentar; horários rígidos para alimentação (BALL; KLINGAMAN, 2007).

Sintomas digestivos variados podem depender da introdução precoce de fórmulas lácteas que, em geral, dificultam a maturação da função motora gastrintestinal, pela ausência do estímulo dos agentes moduladores do leite materno no organismo: o número de regurgitações, por exemplo, pode aumentar pelo retardamento do tempo médio de esvaziamento gástrico determinado pela composição das fórmulas, pelo uso de mamadeiras e volume ofertado por unidade de tempo (SHERMAN et al, 2009); diarréia pode resultar de sobrecarga osmótica no preparo do leite artificial ou oferta excessiva de volume a curtos intervalos de tempo; dificuldade na defecação pode indicar incoordenação entre pressão intra-abdominal e relaxamento do assoalho pélvico nos primeiros meses de vida; constipação pode coincidir com o desmame e com a introdução de fórmula láctea, de alimentos sólidos ou adição de cereais. Todas essas situações decorrem de imaturidade orgânica e/ou erro alimentar e não de uma doença (DOUGLAS, 2005). Por outro lado, pacientes com APLV podem apresentar sintomas semelhantes, em períodos curtos de tempo, que desaparecem com a maturidade do sistema imunológico e estabelecimento da tolerância oral (SALVATORE et al, 2008).

## 2.6 Sintomas e teste de desencadeamento alimentar oral na APLV

Os sintomas relacionados à alergia alimentar podem ser indistintos de outras condições em que o sistema imunológico não está envolvido e o reconhecimento da APLV é um delicado exercício clínico e exige acompanhamento prolongado da criança com suspeita de APLV. A abordagem da biomedicina, nesse caso, é insuficiente na elucidação diagnóstica porque os testes laboratoriais disponíveis não auxiliam, e os diagnósticos, em geral, são realizados de maneira presuntiva por parte dos pais e pediatras, tendo em vista ser o leite de vaca o principal e primeiro alimento introduzido na dieta da criança (MOLONEY; NOWALK-WEGRYZYN, 2006). As queixas dos pais relacionadas à ingestão do leite, na maioria dos casos, não são decorrentes de respostas imunológicas (EGGESBO et al, 1999, 2001); (HEACOCK et al, 1992).

Na maioria das crianças com APLV, os sintomas se iniciam antes de um mês de idade, uma semana após a introdução de fórmula à base do leite de vaca. O início de APLV, após um ano de idade, é muito raro. Reações a outros alimentos, especialmente ovo e soja, ao trigo, peixe, amendoim podem ocorrer em combinação com o leite de vaca, dependendo dos hábitos alimentares regionais (GELLERSTEDT et al, 2004) (BISCHOFF; CROWE, 2005); (WALKER-SMITH, 2003, 2005); (HYMAN et al, 2006).

Diferentes vias de sensibilização têm sido relatadas nos últimos anos, notadamente através do leite materno (BOISSEAU et al. 2009); (MURCH, 2000). Os sintomas podem ser sistêmicos (anafilaxia) ou envolver o trato gastrintestinal (50-60%), pele (50%-60%), trato respiratório (20%-30%) de forma isolada ou em associação (HOST, 2002).

Para a definição dos verdadeiros casos de APLV, além da história clínica e exame físico, um fator relevante é especular, em primeiro lugar, se o sintoma está mesmo relacionado a uma doença. Uma análise criteriosa e individualizada, de cada criança e de cada família, deve ser a prioridade, em todos os casos suspeitos de APLV (GELLERSTEDT; BENGSTSSON; NIGGEMANN, 2007).

Nas reações do tipo imediato, conceitualmente descritas como do tipo IgE, significa que mastócitos ativados e mediadores como histamina e ácido aracídônico são liberados e, em geral, não são observados danos estruturais do trato digestório, mas as funções neuromusculares entéricas são alteradas pelas substâncias vasoativas, nociceptivas e mediadores inflamatórios liberados pelos mastócitos. Nas reações tardias não-IgE, anteriormente não consideradas como verdadeiras reações alérgicas, são mediadas pelas células (JOHANSSON et al, 2001, 2004). As enteropatias induzidas pelas proteínas do leite de vaca podem ocorrer em crianças já tolerantes, dando suporte ao conceito de que, em muitos casos de APLV não IgE mediada, continuarão não reconhecíveis (KOKKONEN, 2004); (ÖSBLON et al, 2009).

A forma de apresentação clínica e o provável mecanismo fisiopatológico devem nortear a investigação na suspeita da APLV. O desencadeamento alimentar duplo cego controlado por placebo (DDCCP) é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da APLV e das outras proteínas alimentares (BINDSLEV-JENSEN et al, 2004). Ainda assim, ainda são frequentes resultados falsos positivos e falsos negativos do teste de desencadeamento alimentar (GELLERSTEDT et al, 2004); (EIGENMANN, 2004); (RANCÉ, 2006); (NIGGEMANN; BEYER, 2005); (NIGGEMANN; BEYER, 2007); (NOWAK-WEGRZYN, 2009).

O intervalo de tempo entre a administração do alimento e a observação da reação clínica é um fator ambivalente à interpretação dos testes: resultados falsos negativos podem ocorrer pela administração inadvertida de drogas durante o período do teste de provação, e existe a hipótese de que uma indução à tolerância seja iniciada, em curto prazo, pela exposição crescente de quantidades de alérgeno (MURARO, 2001); (SAARINEN et al, 2005). Essa tolerância clínica ao alimento, entretanto, pode ser transitória (ROLINCK-WERNINGHAAUS et al, 2005).

A proporção de testes positivos depende de como os sintomas subjetivos são interpretados. Crianças abaixo de um ano de idade, em geral, não apresentam sintomas subjetivos ao desencadeamento alimentar oral. O método mais utilizado para o desencadeamento oral com o alimento é o aberto. A *European Academy of Alergology and Clinical Immunology* recomenda o teste de desencadeamento aberto para crianças com menos de três anos de idade (BINDSLEV-JENSEN et al, 2004); (NOWAK-WEGRZYN et al, 2009). A APLV, com sintomas predominantes gastrintestinais, é do tipo tardio com reações que aparecem após um tempo maior ao teste de desencadeamento alimentar oral e isso é um ponto que deve ser considerado nos casos em que o teste é falso negativo. (BENLOUNES et al, 1999).

## 2.7 Considerações finais

O entendimento do papel das citocinas parece ser o de realçar o mecanismo imunológico predominante no momento em que são aferidas, uma vez que um número grande de pacientes alérgicos tem os dois tipos de sintomas: imediatos e tardios. Como se dá a metamorfose do perfil de citocinas, nesse caso, e durante quanto tempo esse perfil fica definido são perguntas a serem respondidas.

No primeiro ano de vida, nas reações à ingestão do leite de vaca, a imunidade inata, possivelmente, tem uma maior participação e não depende apenas de mecanismos imunológicos em atividade (CARIO, 2008). A identificação do tempo exato em que ocorre a modulação imunológica e subsequente susceptibilidade para a doença alérgica, é necessária para a definição de estratégias preventivas e reconhecimento do envolvimento de alterações imunológicas e os sintomas apresentados. O diagnóstico da APLV com maior grau de certeza, atualmente, só é possível pelo olhar retrospectivo da evolução de cada paciente.

No momento atual do conhecimento sobre patogenia da APLV ao leite de vaca, em crianças de baixa idade, poderíamos concluir com o pensamento de Laplace: "Se uma

*inteligência, num instante, pudesse conhecer todas as forças que governam o mundo natural e a posição de cada ser que o compõe; se essa inteligência fosse suficientemente grande para submeter essas informações à análise, teria como abranger, em uma única fórmula, os movimentos dos corpos do universo e dos menores átomos. Para essa inteligência, nada seria incerto e o futuro tanto quanto o passado se fariam presentes diante de seus olhos”.*

## Referências

- AARDOOM, H. A. et al. Food intolerance (food hypersensitivity) and chronic complaints in children: the parents' perception. **Eur J Ped.** v.156, p.110-12, 1997.
- ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Básica.** 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- ABRAHAN, C.; DENNIS, R.; OWNBY, R. Ontogeny of the allergic inflammatory response. **Immunol Allergy Clin N Am.**, v. 25, p. 215-229, 2005.
- AHRENS, B. et al. Differential diagnosis of food induced syptoms. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 19, p. 92-96, 2008.
- BALL, H; KLINGAMAN, K. **Anthropology of caesarean section birth and breastfeeding:** Rationale for evolutionary medicine on the postnatal ward. 2007.
- BARTUZI, Z. et al. Evaluating the profile of select cytokines in patients with food allergy and chronic gastritis. **Med Sci Monit.** v. 6, p.1128-1135, 2000.
- BENHAMOUN, A. H. An overview of cow's milk allergy in children. **Swiss Med Wkly**; Genève, 139 (21-22), 300-307, 2009. Disponível em: <<http://www.smw.ch>>. Acesso em 10 dezembro 2009.
- BENLOUNES N. et al. The threshold for immune cell reactivity to milk antigens decreases I n cow milk allergy with intestinal syptoms. **J Allergy.** v. 98, p.781-789 1996.
- BENLOUNES, N. et al. The time-course of Milk antigen-induced TNF $\alpha$  secretion differs according to the clinical syptoms in children with cow's milk allergy **J Allergy Clin Immunol.** v. 104, p. 863-869, oct. 1999.
- BEYER, K.; TEUBER, S. The mechanism of food allergy: what do we know today? **Curr Opin Allergy Clin Immunol.** v. 4, n.3, p. 197-9, jun. 2004.
- BEYER, K. et al. Human milk- specific lymphocytes of gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile. **J Allergy Clin Immunol**, v. 109, p.707-713, 2002.

- BISCHOFF, S.; CROWE, S. E. Food allergy and the gastrointestinal tract. **Curr Opin Gastroenterol.**, v. 20, n.2, p.156-61, 2004.
- \_\_\_\_\_. Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives. **Gastroenterology**. v. 128, n. 4, p. 1089-1113, 2005.
- BIGGELAAR, A. H. J. E. et al. Neonatal innate cytokine responses to BCG controlling T-cell development vary between populations. **J Allergy Clin Immunol**, 124, p. 544-50, 2009.
- BINDSLEV-JENSEN, C. et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods - position paper from the European Academy of Alergology and Clinical Immunology. **Allergy**, v.59, n.7, p. 690-97, 2004.
- BLOCK. A.S. Evaluation of IgE mediated food hypersensitivities **JPGN**. 30, p. 20-27, 2000. Supplement.
- BOISSEAU, D. et al. Multiple food allergies: a possible diagnosis in breastfed infants. **Acta Paediatr**. 86, p. 1042-6, 1997.
- BOYCE, J. A. et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy. 119, 2009. Disponível em: <<http://www3.niaid.nih.gov/topics/foodAllergy/clinical/who/comments.htm>>. Acesso: 30/03/2010.
- CALDER, P.C. et al. Early nutrition and immunity – progress and perspectives. **British Journal of Nutrition** . v. 96 n. 4, p.774-790, jun. 2006.
- CARIO, E. Innate immune signaling at intestinal mucosal surfaces; a fine line between host protection and destruction. **Current Opinion in Gastroenterology**. 24, p. 725-732, 2008.
- CHEHADE, M.; MAYER, L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. **J Allergy Clin Immunol**. 115, n.1, p. 3-12, jan. 2005.
- CORREA, M. M. J.; ZULLIANI, A. Imunidade relacionada à resposta alérgica no início da vida. **Jornal de Pediatria**, v.77, n.6, p. 441-446, set. 2001.
- COX, H.; HUSBY, S. Debate: current challenges in management of food allergies. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. 47, S53, 2008.
- DOUGLAS, P. S. Excessive crying and gastro-esophageal reflux disease in infants: misalignment of biology and culture. **Med Hypotheses**. v. 64, 887-98, 2005.
- \_\_\_\_\_. Prevalence of CMA/CMPI in young children: the validity of parentally perceived reactions in a population-base study. **Allergy**, v. 56, p.393-402, 2001.
- EGGESBO, M. et al. Prevalence of parentally perceived adverse reactions to food in young children. **Pediatr Allergy Immunol**. v.10, p.122-132, 1999.
- EIGENMANN, A. P.; FROSSARD. The linfocyte in food-allergy disorders. **Current Opinion in Allergy Clinical Immunology**. v. 3, p. 199-203, 2003.

- EIGENMANN, A. P. Do you have suitable in-vitro diagnostic tests for the diagnostic of food allergy. **Current Opinion in Allergy Clinical Immunology**. v. 4, p. 211-2133, 2004.
- GADINA, M. et al. Sinaling by type I and II cytokine receptor: ten years after. **Current Opinion in Immunology**. V. 13, p. 363-372, 2001.
- GELLERSTEDT, M. et al. Interpretation of subjective symptoms in double-blind placebo-controlled food challenges-interobserver reliability. **Allergy** .v.59, p.354-356, 2004.
- GELLERSTEDT, M.; BENGSTSSON, U.; NIGGEMANN, B. Methodological issues in the diagnostic work-up of food allergy: a real challenge. **J Investig Clin Immunol**.17, n.6 p.350-356, 2007.
- GOLDMAN, A. S. Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective. **J Nutr**. 130, p. 426-31, 2000. Supplement.
- GROLUND, M. M. et al. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: Permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery, **J. Pediatr. Gastroenterol Nutr**. p. 2819-25, 1999.
- \_\_\_\_\_. Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy. A prospective follow-up study of healthy infants aged 0-6 months. **Ach Dis Child**. 83, 186-92, 2000.
- GRUNDY, D. Sensory signals from the gastrointestinal tract. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. 41, 7-9, 2005. Supplement.
- GUPTA, R. S. et al. Food allergy knowledge, attitudes and beliefs: Focus groups of parents, physicians and the general public. **BMC Pediatr**.8, n.36, p. 1-10, 2008.
- HEACOCK, H. J. et al. Influence of breast versus formula milk on physiological gastroesophageal reflux in healthy, newborn infants. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**.14, 41-6, 1992.
- HAUER, A. C. et al The frequency of cells secreting interferon-gamma and interleukin-4, interleukin-5, interleukin-10 in blood and duodenal of children with cow milk hypersensitivity. **Pediatr Res**, v.42, p .629-638, 1997.
- HYMAN, P. E. et al. Childhood Functional Gastrointestinal Disorders: Neonate/Toddler. **Gastroenterology**. 130, p.1519- 25, 2006.
- HILL, D. J.; FIRER, M. A.; HOSKINS, C. S. Natural history of cow's milk allergy: immunological outcome over 2 years. **Clin Exp Allergy**, v. 23, p. 124-131, 1993.

- HILL, D. J.; BALL, G.; HOSKING, C. S. Clinical manifestations of cow's milk allergy in childhood. I. Association with in vitro cellular immune responses. **Clin Allergy**. v.18, p. 469-479, 1988.
- HOST, A. Frequency of cow's milk allergy in childhood. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.89, p.33-37, dec. 2002. Supplement.
- ISHIKWA, H. et al. [Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25+ CD4+ T cells](#). **Clin Exp Immunol**. 153, 127-35, 2008.
- ISSENMAN, R. M. et al. Are chronic digestive complaints the result of abnormal dietary patterns? Diet and digestive complaints in children at 22 and 40 months of age. **Am J Dis Child**. 141,679-682, 1987.
- JARVINEN, K. M. et al. B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. **J Allergy Clin Immunol**., v. 110, 293-7, 2002.
- JOHANSSON S. G. et al. EAACI (The European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force. A revised nomenclature for allergy. An position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy**, v. 56, p.813-24, 2001.
- \_\_\_\_\_. Revised nomenclature for allergy for global use: report of nomenclature review Committee of the world allergy organization, Outubro 2003. **J Allergy Clin Immunol**. v. 113: p. 102-106, 2004.
- JONES,C. A. et al. Does atopic disease start in foetal life? **Allergy**. v. 55, p. 2-10, 2000.
- JYONOUCHI, H. et al. Evaluation of an association between gastrointestinal syptoms and cytokine production against common dietary proteins in children with autism spectrum disorders. **J Pediatr**. v. 146, p. 605-610, may 2005.
- [KALLIOMÄKI, M.](#) et al. Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. **J Allergy Clin Immunol**. v. 104, 1251-7. 1999.
- \_\_\_\_\_. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was not developing. **J Allergy Immunol**, v. 107, 129-134.
- [KALLIOMÄKI, M.](#). The role of microbiota in allergy. **Annales Nestlé**, v.67, n.1, p.19-25, Inglaterra, 2009. Disponível em: <<http://www.karger.com/ane>>. Acesso: 2009.
- KEMP, A. S. et al. Guidelines for the use of infants formulas to treat cow's milk protein allergy: an Australian consensus panel opinion. **MJA**. V.182, n.2, p.109-112 jan./2008.
- KINDT, T. J; GOLDSBYRA, OSBORNE. B. A. **Imunologia de Kuby**. Tradução Ana Cristina Arámburu da Silva et al. 6. ed. Porto Alegre: Art Med, p.331-379.
- KLAUS, B; PIPPER, C. B.; BISGAARD, H. Sensitization does not develop *in utero* **J Allergy Clin. Immunol**. 121, p. 646-51, mar. 2008.

- KO, J.; MAYER L. Oral tolerance: lessons on treatment of food allergy. **European Journal of Gastroenterol Hepatol.** v.17, p. 1299-1303, ago. 2005.
- KODA, Y. K. L.; BARBIERI, D. Evolução ontogenética da digestão e absorção das proteína, dos lípides e dos carboidratos. In: Telles Jr mm. Tanuri U (Eds). *Suprimento Nutricional em Pediatria*, São Paulo: Atheneu, p. 31-38, 1994.
- KOKKONEN, J.; TIKKANEN, S.; SAVILAHTI, S. Residual intestinal disease after milk allergy in infancy. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** v.32, p.156-161, fev. 2001.
- KROGULSKA, A. et al. Cytokines profiles in children with asthma Undergoing food challenges. **J Investig Allergol Immunol.** v. 19, n.1, p.43-48, 2009.
- MARCIORKOWSKA, E; PANASIUK, A; KACSMARSKI, M. Concentrations of gastric mucosal cytokines in children with food allergy and *Helicobacter pylori* infections. **World J Gastroenterol.** V.11, n.43, p.6751-6756, nov. 2005.
- MAYER, L. Mucosal Immunity. **Pediatrics.** v.11, n.6, p.1595-1599, jun. 2003.
- MAC DONALD, T. T; MONTELEONE, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. **Science**, v. 307, p.1920-1925, march, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org>>. Acesso em set. 2009.
- MOLONEY, J.; NOWALK-WEGRYZYN, A. Educational clinical case series for pediatric allergy and immunology: allergic proctocolitis, food protein induced enterocolitis syndrome and allergic Eosinophilic gastroenteritis with protein-losing gastroenteropathy as manifestations of no-IgE mediated cow's milk allergy. **Pediatrallergy Immunol**, v. 18, p. 360-367, 2007.
- MORATO, V. et al. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/ HeJ and BALB/c mice. **J Allergy Clin Immunol.** v.111, p.1122-1128, may 2003.
- MOWAT A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nat Rev Immunol.** v.3, p.331-241, 2003.
- MOWAT, A. M. et al. Oral tolerance: overview and historical perspectives. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1009, p.1-8, 2004.
- MÜLLER, W. Dissecting the cytokine net work. **Cellular Immunology.** v. 244, p. 162-164, apr. 2007.
- MURCH, S. H. The immunologic basis for intestinal food allergy. **Current .Opinion in Gastroenterology.** v.16, p. 552-557, 2000.
- \_\_\_\_\_. Clinical manifestations of food allergy: the old and the new. **European Gastroenterology& Hepatology**, v.17, n.12, p.1287-1291. aug. 2005.

- MURARO, M. A. Diagnosis of food allergy; the oral provocation test. **Pediatr. Allergy Immunol.**, v. 12, p. 31-38, 2001.
- NIGGEMANN, B.; BEYER, K. Diagnosis pitfalls in food allergy in children. **Allergy**. v. 60, p.104-107, 2005.
- \_\_\_\_\_. Diagnostic pitfalls in double-blind, placebo oral food challenges. **Allergy**, v. 62, 729-732, 2007.
- \_\_\_\_\_. Diagnosis of food allergy in children: toward a standardization of food challenge. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** v.45, n.4, p. 399-404, 2007.
- NIGGEMANN, B et al. Controlled oral food challenges in children-when indicated, when superfluous **Allergy**.v.60, p.865-870, 2005.
- NOMA, T. et al. Cytokine production in children outgrowing hen egg allergy- **Clinical and Experimental Allergy**. v. 26, p. 1298-1307, june 1996.
- NOWAK-WEGRSYN, A; SAMPSON H.A, Adverse reactions to foods. **Med Clin N A.** 90, p. 97-127, 2006.
- NOWAK-WEGRZYN, A. et al. Work Group report: oral food challenge testing. **J Allergy Clin Immunol.** v. 123, n. 6, p. 365-83, 2009. Supplement.
- ÖSBLON E. et al. Patterns of quantitative food-specific IgE antibodies and report food hypersensitivity in 4-year-old children. **Allergy**. v. 63, p. 418-424, 2008.
- PAAJANEN, L. et al. Increased INF- $\gamma$  secretion from duodenal biopsy samples in delayed-type cow's milk allergy. **Pediatric Allergy and Immunology**. v.16, p. 439-444, 2005.
- PENDERS, J. et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota during the first year of life. **Pediatrics**, v.118, p. 511-521, 2006.
- PEREZ-MACHADO, M. A. et al. Reduced transforming growth factor  $\beta$ -1 reducing T cells in duodenal mucosa of children with food allergy. **Eur J Immunol**, v. 33, p. 2307-2315, 2003.
- \_\_\_\_\_. Spontaneous Th1 cytokine production by intraepitelial but not circulating cells in infants with and without food allergies. **Allergy**. v.5 9, p. 346-353, 2004.
- PERON, J. P. S.; OLIVEIRA, A. P. L.; RIZZO, L. V. It takes guts for tolerance: The phenomenon of oral tolerance and the regulation of autoimmune response. **Autoimmune Rev**.9, p.1-4, 2009.
- PROKESOVA, L. et al. Cytokine levels in healthy and allergic mothers during the first year of life. **Pediatr Allergy Immunol.** v. 17, p.175-183, jan. 2006.
- RAGUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. **Seem Immunol.** v. 13, p. 933-938, 2001.

- RANCÉ, F. Prise en charge diagnostique et thérapeutique alimentaires de l'enfant. **Revue Française D'Allergologie et D'Immunologie Clinic.** v. 46, p. 22-26, 2006. Supplement.
- RAUTAVA, S.; KALLIOMÄKI, M.; ISOLAURI, E. Robotics during pregnancy and breast feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. **J Allergy Immunol.** v. 109, p. 119-21, 2002.
- REINER, S. L. Helper T cell differentiations: inside and outside. **Current Opinion in Immunology.** v. 1, p. 351-355, 2001.
- RYCÖNEN, J. et al. BCG vaccine modulates intestinal and systemic responses to  $\beta$ -lactoglobulin. **Pediar Allergy Immunol.** v. 15, p. 408-414, 2004.
- RONA, R.J.; KEIL, T.; SUMMERS, C. et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. **J Allergy Clin Immunol.** v.120, p.638-46, 2007.
- SALVATORE, S. et al. Chronic enteropathy and feeding in children: An update. **Nutrition.** 24, p. 1205-1216. apr./2008.
- SAMPSON, H. A. Update on food allergy. **J Allergy Clin Immunol.** v.113, p. 805-819, 2005.
- SAARINEN, K. M. et al. Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. **J Allergy Clin Immunol.** v.116, p.116-869, oct. 2005.
- SCOTT-TAYLOR, et al. Patterns of food specific cytokine production by lymphocytes of children with multiple allergies. **Clin Exp Allergy.** v. 35, p.1431-1480, 2005.
- SHERMAN, P. et al. A global Evidence based consensus on definition of gastroesophageal reflux disease in children. **Am J Gastroenterol.** V. 104, p.1278-95, 2009.
- SICHERER S. H. Clinical aspect of gastrointestinal food allergy in childhood. **Pediatrics**, v.11, p.1609-1616, 2003.
- SICHERER, S.H.; SAMPSON H.A. Food allergy **J Allergy Clin Immunol.** v.117, p470-475, 2006.
- SICHERER S. H.; TEUBER, S. Current approach to the diagnosis and management of adverse reactions to food. **J Allergy Clin Immunol.** v.114, p.1146-1150, 2004.
- SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food allergy: recent advance in pathophysiology and treatment. **Annual Rev Med.** 2009; 60, p. 261-77, 2009.
- SOLÉ, D. et al (coord.). Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia. Consenso Brasileiro sobre alergia alimentar, 2007. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.** v. 31, n. 2, 2008.
- STROBEL, S.; MOWAT, A.M., Immune responses to dietary antigens oral tolerance. **Immunology Today.** Vol.19, n. 4, p. 173-181, apr. 1998.

- \_\_\_\_\_. ***Curr Opin Allergy Clin Immunol.*** v.6, n.3, p. 207-13, jun. 2006.
- SUDO, K. et al. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. ***J Imunol.*** v. 159, n.4, p.1739-45, 1997.
- TEITELBAUM, E. J.; WALKER, W.A. The development of mucosal immunity. ***European Journal of Gastroenterology & Hepatology.*** 17, 1273- 1278, 2005.
- TURCANU, V.; SOHEILA J, M.; LACK,G. Characterization of lymphocyte responses in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. ***J. Clin. Invest.*** 111, p. 1065-1072, abr. 2003.
- UDALL, J.N. et al. Development of gastrointestinal mucosal barrier. II. The effect of natural *versus* artificial feeding on intestinal permeability to macromolecules. ***Pediatr Res.*** 15, 245-9, 1981.
- VANDERPLAS, Y. et al. Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. ***Arch. Dis. Child.*** 92: 902-908, 2007. Disponível em: <<http://adc.bmjjournals.com>>. Acesso em 11 jun. 2009.
- VENTER. C. et al. Incidence of parentally reported and clinically diagnosed food hypersensitivity in the first year of life. ***J Allergy Clin Immunol.*** v.117, p. 1118-1124, may/2006.
- VENTER, C. et al. Prevalence and cumulative incidence of food hypersensitivity in first 3 years of life. ***Allergy.*** v. 63, p. 354-359, 2008.
- VERES, G.; ORMIO, M. W.; KOKKNEN, J. et al. Cytokines and adhesion molecules in duodenal mucosa of children with delayed-type food allergy. ***Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition,*** jul. 2003.
- WALKER-SMITH, J. Cows milkallergy: a new understanding from immunology. ***Ann Allergy Asthma Immunol.*** v.90 p. 81-83, jan. 2003. Supplement.
- \_\_\_\_\_. An eye witness perspective of change patterns of food allergy. ***European Journal of Gastroenterology & Hepatology.*** v.17, n.12, p.1313-1316, aug. 2005.
- ZUBERBIER, T.; EDENHARTER, G.; WORM, M. Et al. Prevalence of adverse reactions to food in Germany: a population study. ***Allergy,*** v. 59, p.338-45, 2004.

## *3 MÉTODOS*

---

## **3 Métodos**

---

---

### **3.1 Aspectos gerais**

#### *3.1.1 Planejamento do estudo*

Estudo exploratório envolvendo um grupo de crianças com suspeita de alergia à proteína do leite de vaca (APLV). Após a inclusão do paciente no estudo, era coletado sangue para aferição de imunoglobulinas E total e específicas e concentração de interleucina-4(IL-4) e interferon-gama (INF- $\gamma$ ). Em seguida, foi realizado o teste de desencadeamento alimentar oral aberto para definição do grupo caso (com APLV) e do grupo comparativo (sem APLV). A partir da formação dos grupos, foram avaliados os sintomas relatados pelos pais e pediatras e a concentração sérica de IL-4 e INF- $\gamma$ .

#### *3.1.2 Local e período*

O estudo foi realizado no Ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), situado na cidade do Recife, que atua nas áreas de assistência, ensino e pesquisa e atende a populações carentes da região. Pacientes oriundos de clínica privada foram incluídos no estudo, contudo, durante a pesquisa, foram atendidos no HC-UFPE.

O recrutamento e a coleta de dados foram realizados de maio de 2007 a outubro 2008.

#### *3.1.3 População*

Crianças atendidas com sintomas relacionados à ingestão do leite de vaca foram recrutadas nos Ambulatórios de Gastroenterologia Pediátrica do HC-UFPE, do Hospital da Restauração (HR) e clínicas privadas de cidade do Recife. Das 65 crianças que participaram desta pesquisa, apenas seis eram procedentes de clínicas privadas.

### 3.1.4 Estimativa do tamanho amostral

A amostra foi calculada para o estudo das concentrações séricas de INF- $\gamma$  e IL-4 em crianças com e sem APLV. Utilizou-se como referência o estudo de Bartuzi *et al.* (2000), no qual foi caracterizado o perfil de citocinas nos pacientes com alergia alimentar e com dispepsia funcional, não alérgicos. A concentração sérica de IL-4 foi 27,85 pg/mL nos pacientes com alergia alimentar e 4,31 pg/mL naqueles com dispepsia funcional (BARTUZI *et al.*, 2000).

O tamanho da amostra foi estimado pela fórmula de comparação de duas médias (KIRKWOOD, 1988):

$$N = \frac{(u + v)^2 (DP_1^2 + DP_2^2)}{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^2}$$

Onde:

N = tamanho da amostra para cada grupo

u = 2,33 para o poder estatístico de 99% (monocaudal)

v = 1,96 para o nível de significância de 5% no teste bicaudal

DP<sub>1</sub> = desvio-padrão de IL-4 no grupo com alergia alimentar

DP<sub>2</sub> = desvio-padrão de IL-4 no grupo sem alergia alimentar

$\bar{x}_1$  = média de IL-4 no grupo com alergia alimentar

$\bar{x}_2$  = média de IL-4 no grupo sem alergia alimentar

Então:

N = 40 pacientes por grupo

Adotando esses critérios, a amostra foi prevista para 80 crianças, sendo 40 com alergia à proteína do leite de vaca (APLV) e 40 no grupo comparativo, sem APLV. Ao término da pesquisa, 35 casos com APLV e 30 controles sem APLV foram incluídos na análise. Para o estudo dos sintomas, não foi calculada amostra, aproveitando-se a oportunidade dos grupos caso e comparação formados após o teste de desencadeamento alimentar oral.

### **3.2 Critérios de inclusão e exclusão ao estudo**

Foram admitidas ao estudo crianças encaminhadas ao Ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do HC-UFPE, com quadro clínico suspeito de APLV, ainda consumindo o leite de vaca ou expostos através do aleitamento materno. Foram excluídos da pesquisa os pacientes que estavam em dieta de isenção de proteínas do leite de vaca, em uso de antialérgicos, prematuros de muito baixo peso ao nascer, que apresentavam outras doenças do trato digestório e os que referiam, isoladamente, baixo ganho de peso, sintomas respiratórios.

### **3.3 Definição do grupo caso e grupo comparativo**

Antes de definir os grupos de estudo, os pacientes realizaram o teste de desencadeamento alimentar oral.

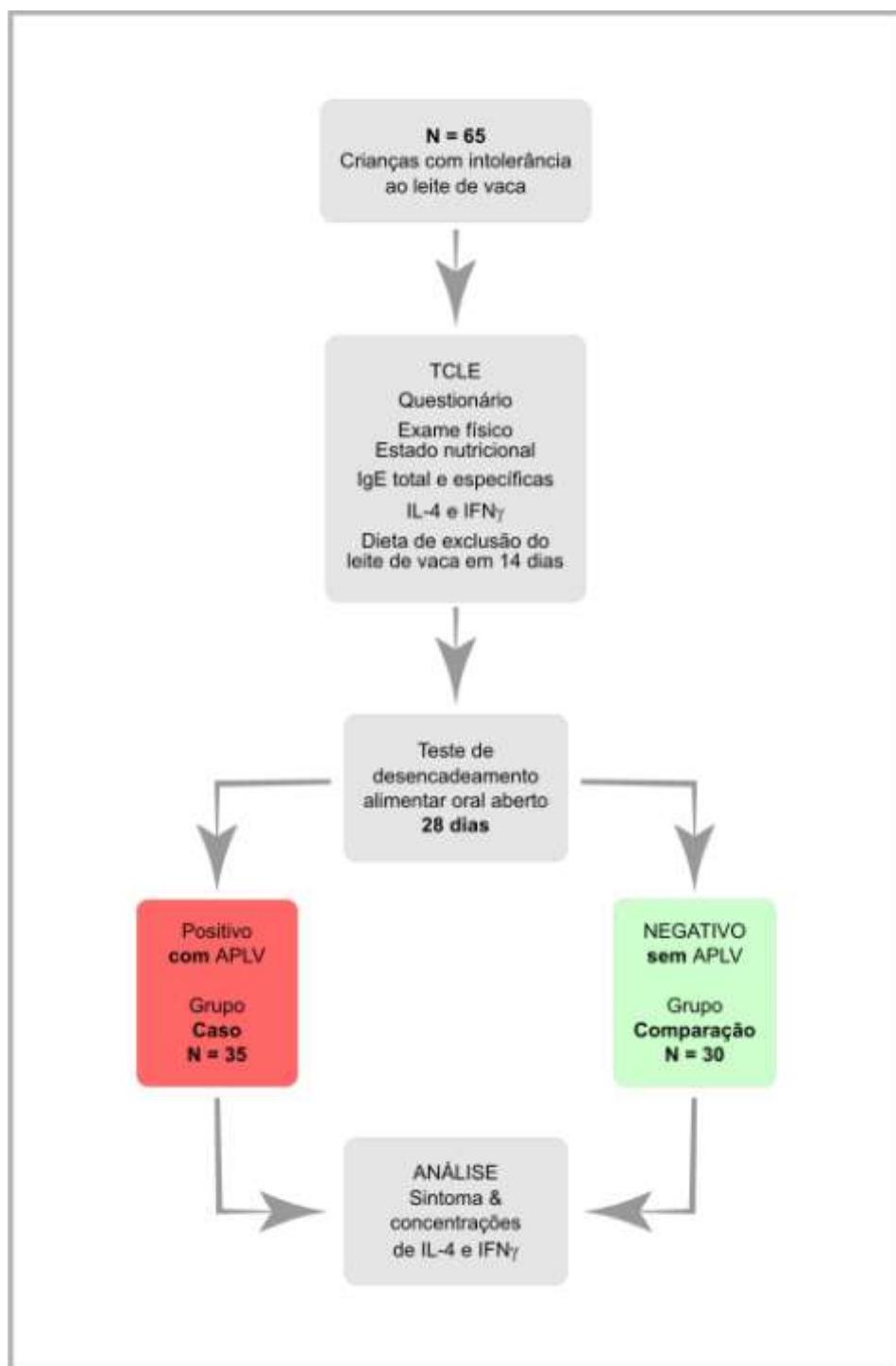
#### *3.3.1 Grupo caso*

Foi incluído neste grupo o paciente que apresentou o teste de desencadeamento alimentar oral positivo, ou seja, que apresentava os mesmos sintomas relatados antes da realização do teste em qualquer momento do período de observação.

#### *3.3.2 Grupo comparativo*

Foi incluído neste grupo o paciente que apresentou o teste de desencadeamento alimentar oral negativo, ou seja, após todo o período de observação do teste, não apresentava os mesmos sintomas relatados antes da realização do teste. O fluxograma a seguir demonstra a distribuição das crianças da pesquisa. Figura 1

Figura 1 – Fluxograma do desenvolvimento da pesquisa



### **3.4 Aspectos éticos**

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde CEP/CCS/ UFPE) Reg. n.197/06(ANEXO-A) e cumpriu as determinações da Declaração de Helsinque (WORLD MEDICAL ASSOCIATION, 1997) e normas da resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde.

As famílias participantes foram esclarecidas verbalmente sobre os objetivos, operacionalização e os aspectos éticos da pesquisa. Em seguida, um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de cada participante da pesquisa (APÊNDICE-A).

A coleta de sangue para os exames foi realizada com o máximo de cuidado para não causar sofrimento desnecessário. Foi utilizado um laboratório conveniado no qual foram determinadas as concentrações de IgE séricas específicas, para evitar duas punções venosas, previstas para obtenção de material biológico para citocinas e IgEs . Os pacientes com alergia à proteína do leite de vaca permaneceram em acompanhamento no ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do HC-UFPE. Os pacientes que não tiveram o diagnóstico confirmado foram contrarreferenciados aos serviços de origem para continuarem a investigação dos sintomas; os pacientes que não puderam ser incluídos, por estarem em tratamento, foram encaminhados para teste de desencadeamento alimentar oral pela rotina do serviço. Os pacientes tiveram durante todo o período da pesquisa, acesso facilitado à pesquisadora (por telefone fixo e celular) e equipe da clínica pediátrica do HC (pediatras, nutricionistas e assistência social) por telefone e reavaliações com e sem agendamentos prévios.

### **3.5 Operacionalização**

#### *3.5.1 Recrutamento*

A pesquisadora solicitou o encaminhamento dos pacientes com suspeita de APLV aos pediatras e especialistas em gastroenterologia e alergia pediátrica, através de carta (APÊNDICE-2) e comunicação verbal. Era relatado, em linhas gerais, o planejamento da pesquisa em realização no ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC).

### 3.5.2 Coleta de Dados

A coleta de dados foi realizada pela pesquisadora e por uma aluna do curso de Medicina, bolsista da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), que recrutaram os pacientes, aferiram as medidas do peso e estatura, preencheram os formulários clínicos e identificaram os tubos para coleta de sangue de todos os participantes. A coleta de sangue foi realizada em laboratório externo, auxiliado pela pesquisadora, que também foi responsável pelo armazenamento dos tubos em recipiente térmico e transporte do sangue, para dosagem de citocinas, ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE), na medida em que eram coletados.

### 3.5.3 Identificação

Os participantes da pesquisa foram identificados por um número composto por dois dígitos na sequência de admissão ao estudo. Os formulários de pesquisa e os tubos de coleta eram identificados com o número e o nome de cada participante.

### 3.5.4 Coleta, transporte e armazenamento do sangue

Os participantes foram submetidos a punção venosa e coleta de seis ml de sangue. Para esse procedimento, utilizou-se agulha e tubo para coleta por sistema de vácuo. Três ml foram coletados em tubo seco e 3ml em tubo com gel separador, sendo os tubos armazenados em caixas térmicas e transportados ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE, no fim de cada turno de coleta.

No Laboratório Marcelo Magalhães (externo), 6 ml de sangue foram distribuídos em alíquotas de 3ml para determinação de IgE total e específicas e citocinas. Um tubo com gel separador foi transportado imediatamente ao LIKA, onde foram centrifugados, e os soros obtidos foram armazenados em Ependorf. Os tubos Ependorf foram identificados e armazenados a 18° C em “freezer”. Após o término da coleta de sangue de todos os pacientes, foram determinadas as concentrações do interferon-gama e interleucina-4.

## 3.6 Avaliação clínica

Um formulário com perguntas fechadas foi elaborado para pesquisar sintomas e condições associados à alergia à proteína do leite de vaca. Os sintomas gastrointestinais (regurgitação, vômito, dor abdominal, diarreia, distensão abdominal, constipação), cutâneos, respiratórios e gerais, além do exame físico foram anotados no formulário estruturado. O formulário das avaliações clínica e laboratorial encontra-se no APÊNDICE-B.

### **3.7 Avaliação do estado nutricional**

O estado nutricional foi avaliado com base na idade, peso (em quilogramas), comprimento e estatura (em centímetros). A aferição foi feita conforme recomendado por (GIBSON, 1990) O peso foi mensurado em uma balança digital (Filizola- Brasil) com a criança despida. O comprimento ou estatura foi aferido com estadiômetro de bebê, nos menores de dois anos, e de parede (Tonelli-Brasil) com a criança descalça e com a coluna e membros inferiores retificados. Os índices antropométricos Peso/Idade, Altura/Idade foram calculados pelo programa Epi-Info versão 3.3.2, com base nos valores de referência do CDC 2000. O valor do ponto de corte para baixo peso e baixa estatura foi o percentil menor de cinco

### **3.8 Laboratório**

#### *3.8.1 Dosagem de IgE total e específicas*

O nível de IgE total e específicas foi determinado pelo **UNIVERSAL 3g ALLERGY e IgE ESPECÍFICA IMMULITE 2000 3g**, um imunoensaio por electroquimioluminescência com dois passos reacionais, baseado numa tecnologia de fase líquida e em esferas revestidas. Os alérgenos ligam-se covalentemente a uma matrix solúvel polimérica/copolimérica que, por sua vez, está marcada com um ligando. A utilização de um aminoácido copolimérico permite aumentar a quantidade de alergênio que se liga à matriz. Ciclo de incubação: 2x 30 minutos. Interpretação dos resultados: a classe é uma indicação da quantidade endógena de IgE para um determinado alergênio. Os resultados são expressos em KU/L, em sistema padrão, com os seguintes pontos de corte, (quadro 1). Considerou-se positivo para IgE específicas o valor igual ou acima da classe III ( 3,5-17,5 KU/L). A aferição das IgEs foi realizada no mesmo dia da coleta de sangue, no laboratório Marcelo Magalhães.

### Quadro 2

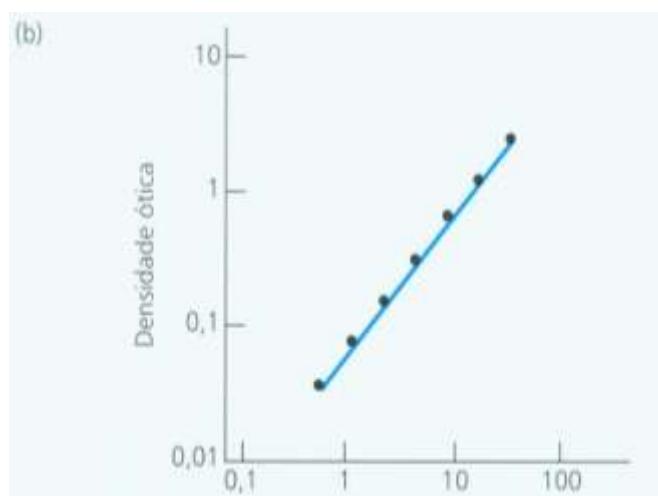
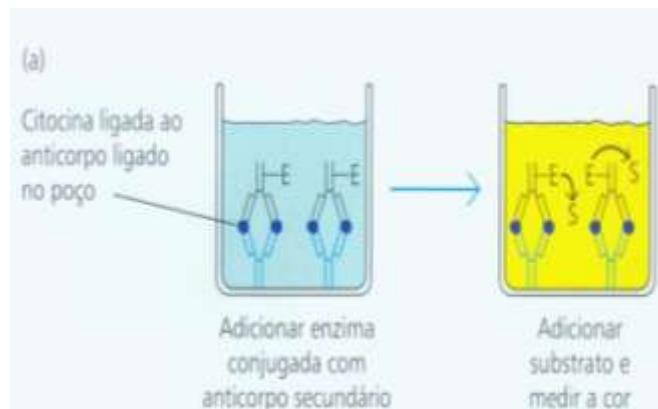
Classe	KU/L	REATIVIDADE AOS COMPONENTES ALERGÊNICOS
<b>0</b>	<b>&lt;0,10</b>	<b>AUSENTE OU INDETECTÁVEL PELO MÉTODO</b>
<b>I</b>	<b>0,10-0,34</b> <b>0,35-0,69</b>	<b>MUITO BAIXO</b>
<b>II</b>	<b>0,70-3,49</b>	<b>MODERADO</b>
<b>III</b>	<b>3,50-17,49</b>	<b>ELEVADO</b>
<b>IV</b>	<b>17,5-52,9</b>	<b>MUITO ELEVADO</b>
<b>V</b>	<b>52,5-99,99</b>	<b>MUITO LEVADO</b>
<b>VI</b>	<b>&gt;100</b>	<b>MUITO ELEVADO</b>

NOTA: Critério estabelecido pelo fabricante

#### 3.8.2 Determinação das citocinas IL-4 e INF $\gamma$ (ELISA):

- (a) a amostra contendo a citocina de interesse é capturada por um anticorpo específico (azul) coberto em uma placa de microtitulação. Um segundo anticorpo específico (em azul), conjugado com uma enzima (E), como a peroxidase, forma um sanduíche com a citocina capturada, imobilizando a enzima no poço de microtitulação. Um substrato cromogênico (S) é adicionado e a enzima gera uma cor cuja intensidade é proporcional à quantidade de citocina ligada ao anticorpo de captura produzida. A densidade ótica dessa cor produzida pelo desconhecido é comparada em uma curva padrão determinada;
- (b) a curva mostrada aqui é para interleucina-4 humana. Esse ensaio é suficientemente sensível para detectar até 1 picograma de interleucina.

### Figuras do ensaio



Concentração de IL-4(pg/mL)

Ao completar a coleta dos sessenta e cinco pacientes, foram determinadas as concentrações de INF  $\gamma$  e IL-4, no Laboratório de Imunopatologia (LIKA), pelo método *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), utilizando pares de anticorpos monoclonais comerciais com o *kit* QUANTI<sup>KINE</sup>® HS (HIGH SENSITIVITY ELISAs) HUMAN IL-4 IMMUNOASSAY, E HUMAN INF- $\gamma$  para determinação quantitativa de interleucina quatro (IL-4) e INF- $\gamma$ , em cultura de células e sobrenadantes e no soro, de acordo com as instruções do fabricante (R&D SYSTEMS, MINNEAPOLIS, MN55413 USA), disponíveis da seguinte forma:

1 - os soros e os reagentes foram colocados em temperatura ambiente por trinta minutos. Os reagentes foram diluídos conforme as instruções do manual do fabricante. Foram preparados todos os reagentes e reconstituição da citocina padrão (IL-4 ou INF- $\gamma$ ) com 5 mL de diluente apropriado (Calibrator Diluente HD6U). Essa reconstituição resulta numa solução de 16 pg/mL para IL-4. Após quinze minutos, foram pipetados 500  $\mu$ L da solução calibradora para 6 tubos de ensaio em série para diluições sucessivas de um tubo a outro. A solução sem

diluente serviu como a maior padrão (16/ $\mu$ L/mL). O diluente calibrador apropriado serviu com o padrão zero (0 pg/mL);

2 - foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato, recobertas com os anticorpos monoclonais específicos para a captura de cada citocina a ser dosada. Às fileiras um e dois de cada placa foram adicionados 50 $\mu$ L de citocina padrão recombinante, seguindo diluições seriadas 1:2 em solução salina tamponada com fosfato (PBS), contendo 2% de soro albumina humana (BSA), a partir das concentrações iniciais diluídas. Os poços correspondentes ao branco da reação não receberam citocinas ou soro;

3 - às outras fileiras foram adicionados 200 $\mu$ L/poço do soro contendo a citocina a ser dosada. As placas foram incubadas durante 3 horas e lavadas quatro vezes com uma solução tampão;

4 - a seguir, foram adicionados 200 $\mu$ L em cada poço do anticorpo anticitocina a ser dosada e as placas foram incubadas por duas horas, a 37°C e, novamente, lavadas quatro vezes;

5 - após essa etapa, foram adicionadas 50 $\mu$ L de solução amplificadora em cada poço e incubada por trinta minutos, em temperatura ambiente;

6 - adicionou-se a solução finalizadora (*Stop solution*) em cada poço e procedeu-se à leitura após trinta minutos. Os resultados foram determinados pela diferença entre as absorbâncias obtidas: 405 e 490nm (Abs 405–Abs 409), medidas em um leitor automático de ELISA.

7 - as concentrações das citocinas no soro foram determinadas pela comparação com as absorbâncias obtidas, em uma curva padrão da respectiva citocina recombinante, realizada, simultaneamente, e expressa em pg/ml. A sensibilidade do ensaio foi de 10pg/ml.

As instruções e todos os passos do experimento utilizados neste estudo para aferição da IL-4 e Interferon- $\gamma$  estão reproduzidas no ANEXO B.

### 3.9 Teste de desencadeamento alimentar oral aberto

O teste de desencadeamento alimentar oral para proteína do leite de vaca foi realizado após a coleta dos exames complementares: crianças e mães, quando ainda amamentando, foram orientadas para seguir uma dieta de exclusão do leite de vaca e derivados, durante, pelo menos, duas semanas (tempo mínimo recomendado na literatura). Foi fornecido um folheto explicativo, e orientado verbalmente, com o nome dos alimentos e rotulagem dos produtos

industrializados de alimentos que contêm leite e derivados, assim como os cuidados na manipulação dos alimentos para evitar a contaminação com proteínas do leite de vaca, (APÊNDICE-C). Havendo resolução dos sintomas, as crianças eram reexaminadas e, se em bom estado clínico, admitidas à enfermaria de Clínica Pediátrica do HC-UFPE, por vinte e quatro horas, para realização do teste de desencadeamento alimentar oral aberto modificado, de Isolauri e Hill, Sampson e Chapman. Calculou-se a dose 0,5g/Kg de proteína do leite de vaca para volume de 90-200 ml de fórmula láctea sem lactose e procedeu-se da seguinte forma:

- 1) tempo 0: aplicou-se com uma gaze cerca de 2 mL de leite de vaca na pele do antebraço esquerdo;
- 2) tempo 15': aplicou-se com gaze cerca de 2 mL de leite de vaca na região perioral;
- 3) a partir do tempo 30', a cada 15 minutos, ofertou-se o leite de vaca gradativamente, em porções de 1%, 4%, 10%, 20%, 20% e 25% do volume total calculado até o aparecimento dos sintomas referidos pelos pais do paciente, antes do teste de desencadeamento, quando o teste era imediatamente interrompido e efetuadas as medidas de suporte, previstas necessárias, e a criança era classificada no grupo com APLV.

Se os sintomas não se reproduziam durante o internamento, o paciente recebia alta, com orientação de continuar a consumir o leite de vaca, na quantidade habitual, pré-teste, 2 a 3 vezes por dia, com reavaliações semanais agendadas e com livre acesso ao pesquisador e ao serviço, a qualquer momento em que o sintoma ocorresse dentro de quatro semanas subsequentes à alta hospitalar.

Os pacientes que não reproduziram os sintomas até o final da observação foram incluídos no grupo sem APLV, grupo comparativo, e foram contrarreferenciadas para continuar a investigação dos sintomas. Os pacientes com APLV foram mantidos em acompanhamento no ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do HC.

### **3.10 Variáveis do estudo**

As variáveis do estudo foram classificadas em: de caracterização da amostra, de definição dos pacientes com alergia à proteína do leite de vaca/grupo de comparação sem alergia à proteína do leite de vaca e de análise quanto aos sintomas e concentrações do interferon-gama e interleucina-4.

Quadro 4 – Descrição das variáveis do estudo

Tipo	Nome Codificação do banco de dados	Definição	Categorização	Resultados permitidos
De caracterização da amostra	Sexo (sexo)	Autoexplicativa	Qualitativa, dicotômica	Masculino (1) Feminino (2)
	Idade (idade)	Idade em meses, no momento da inclusão ao estudo	Quantitativa discreta	meses
	Sintomas Digestivos	Diarreia, vômitos, regurgitações, constipação, distensão abdominal, dor abdominal, sangramento retal, fissura anal, proctite	Qualitativa, dicotômica	Não (0) Sim (1)
	Sintomas cutâneos	Eczema, placa, urticária	Qualitativa, dicotômica	Não (0) Sim (1)
	Sintomas respiratórios	Rinite, asma, tosse crônica	Qualitativa, dicotômica	Não (0) Sim (1)
	IgE total	Concentração sérica de imunoglobulina E total	Quantitativa, discreta	Mediana Percentil 25 e 75
	Caseína	Concentração sérica de IgE específica anti-caseína	Quantitativa, discreta	Mediana Percentil 25 e 75
	α-lactoalbumina	Concentração sérica de IgE anti- α-lactoalbumina	Quantitativa, discreta	Mediana Percentil 25 e 75
	β- lactoglobulina	Concentração sérica de IgE anti-β-lactoglobulina	Quantitativa, discreta	Mediana Percentil 25 e 75
Definidoras de casos e grupo de comparação	Teste de desencadeamento alimentar oral (TDAO)	Reprodução dos mesmos sintomas referidos antes do TDAO	Qualitativa, dicotômica	Não (0) Sim (1)
De análise	Sintomas digestivos	Diarreia, vômitos, regurgitações, constipação, sangramento retal, proctite	Qualitativa, dicotômica	Não (0) Sim (1)
	Sintomas cutâneos	Eczema, placa urticária	Qualitativa, dicotômica	Não (0) Sim (1)
	Sintomas respiratórios	Rinite, asma, tosse crônica	Qualitativa, dicotômica	Não (0) Sim (1)
	Percentil do peso (peso)	Peso em quilogramas classificado segundo a curva do CDC, 2000.	Quantitativa, contínua	0 a 100
De análise	Percentil do comprimento ou estatura (centímetros)	Estatura / comprimento em centímetros, classificada segundo a curva do CDC, 2000	Quantitativa, discreta	0 a 100
	Interleucina- 4	Concentração sérica de Interleucina-4	Quantitativa, discreta	Mediana Percentil 25 e 75
	interferon-gama	Concentração sérica de Interferon-gama	Quantitativa, discreta	Mediana Percentil 25 e 75

### **3.11 Banco de dados**

Os dados foram armazenados no banco de dados do pacote estatístico EPIINFO 3.2.3 for Windows. A digitação dos dados foi feita pela pesquisadora.

### **3.12 Análise estatística**

As variáveis quantitativas foram expressas por medianas e quartis, e as qualitativas, em proporções. As diferenças de frequências e a associação entre as variáveis qualitativas foram testadas pelo teste do qui-quadrado ou exato, de Fisher. As variáveis contínuas foram sumarizadas por medianas e comparadas entre grupos, com e sem alergia à proteína do leite de vaca, pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância estatístico adotado nos testes foi  $\leq 0,05$ .

### **3.13 Financiamento**

Esta pesquisa recebeu financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil). O processo está registrado sob o número 475291/2006-9. Edital universal 2006.

## **Referências**

- BARTUZI, Z. et al. Evaluating the profile of select cytokines in patients with food allergy and chronic gastritis. **Med Sci Monit.** v. 6, p. 1128-1135, 2000.
- CHAPMAN, J. A. BERNSTEIN I. L.; LEE, R. E. Food Allergy: a practice parameter. **Ann Allergy Asthma Immunol.** 96, p. 1-68, 2006. Supplement.
- GIBSON, R. S. Evaluation of anthropometric indices In: Principles of nutritional assessment. New York: Oxford University Press, p. 248-261, 1990.
- ISOLARI, E.; HILL, D. J. Guide for paediatricians on the diagnosis and treatment of severe cow milk allergy and multiple food protein intolerance in infancy. VIEIRA, M. C. et al. Guia de diagnóstico e tratamento da alergia a proteína do leite de vaca. p. 21-24, 2004.

KIRKWOOD, B. R. *Essentials of medical statistics*. Oxford: Blackwell Cscientific publications, 1988.

KUCZMARSKI, R. J. et al. 2000 CDC growth charts for the United States: Methods and development. **Vital Health Stat**, v. 246, may 2002.

SAMPSON, H. A. Update on food allergy. **JAllergy Clin. Immunol.** v. 113, p. 805-810, 2004.

WORLD MEDICAL ASSOCIATION. Declaration of Helsinki: Recommendation guiding physicians in biomedical research involving human's subjects. **JAMA**, Chicago, v. 277, p. 925-926, mar. 1997.

## ***4 RESULTADOS***

## ***ARTIGO ORIGINAL I***

---

**TESTE DE DESENCADEAMENTO ALIMENTAR ORAL NA CONFIRMAÇÃO  
DIAGNÓSTICA DA ALERGIA À PROTEÍNA DO LEITE DE VACA<sup>1</sup>****Oral food challenge testing in confirming the diagnosis of cow's milk allergy****Resumo**

**Objetivo.** Verificar a prevalência de alergia à proteína do leite de vaca em crianças com sintomas atribuídos à ingestão do leite de vaca.

**Métodos.** Foram estudadas 65 crianças com sintomas atribuídos à ingestão do leite de vaca. A definição diagnóstica ocorreu após teste de desencadeamento alimentar oral aberto, realizado no mínimo 15 dias após dieta de exclusão e ausência de sintomas, com período de observação de até quatro semanas após o teste. Considerou-se caso (alergia à proteína do leite de vaca positiva; N=35) criança com reaparecimento do sintoma que motivou a realização do teste e comparação (alergia à proteína do leite de vaca negativa; N=30), aquela sem sintomas após o período de observação do teste.

**Resultados.** A mediana de idade foi 5 meses (P25=2- P75=9 meses) no grupo caso e 7 meses (P25=4-P75=11 meses) no grupo comparação ( $p=0,05$ ). O teste não confirmou alergia à proteína do leite de vaca em 46,8% dos pacientes com sintomas atribuídos à ingestão de leite de vaca. Reação tardia ocorreu em 77,1% (27/35) dos casos com teste positivo, sendo 18/27 na primeira, 3/27 na segunda e 6/27 na terceira semana de observação. Encontrou-se associação estatística significante entre manifestações cutâneas e teste positivo ( $p=0,04$ ), mas não com sintomas digestivos e respiratórios.

**Conclusão.** Os resultados corroboram a necessidade do teste de desencadeamento alimentar oral para determinar os pacientes que realmente têm alergia à proteína do leite de vaca e se beneficiarão com dieta de exclusão de leite de vaca.

**Palavras-chave.** hipersensibilidade a leite, condições patológicas, sinais e sintomas, lactente; pré-escolar.

---

<sup>1</sup> Artigo submetido ao Jornal de Pediatria em 25/02/2010 aceito em 19/04/2010.

**Abstract**

**Aim.** To determine the prevalence of cow's milk protein allergy in children with symptoms attributed to the ingestion of cow's milk.

**Methods.** Sixty-five children with symptoms attributed to the ingestion of cow's milk were studied. The diagnosis was reached after an open oral food challenge test carried out at least fifteen days after an exclusive diet and disappearance of symptoms, with a period of observation of up to four weeks subsequent to the test. Children that remained asymptomatic after this period were considered positive for cow's milk protein allergy (N=35), while those whose symptoms reappeared were considered negative.

**Results.** The median age was 5 months (P25=2-P75=9 months) in the case group and 7 months (P25=4-P75=11 months) in the comparison group ( $p=0.05$ ). The test did not confirm cow's milk protein allergy in 46.8% of patients with symptoms attributed to the ingestion of cow's milk. A delayed reaction occurred in 77.1% (27/35) of cases testing positive, 18/27 in the first week, 3/27 in the second, and 6/27 in the third week of observation. A statistically significant association was found between cutaneous manifestations and a positive test result ( $p=0.04$ ), but not in the case of digestive and respiratory symptoms.

Conclusion: The results confirm the need for an oral food challenge test to determine which patients truly have cow's milk protein allergy and can therefore benefit from a diet free of cow's milk.

**Key-words.** Milk hypersensitivity; pathological conditions, signs and symptoms; infant; preschool.

## Introdução

A prevalência da alergia à proteína do leite de vaca (APLV) é descrita entre 2 a 8%.<sup>1,2</sup> Os resultados são conflitantes e de difícil comparação devido aos diversos critérios diagnósticos e desenhos de estudo utilizados, sendo maiores as prevalências baseadas exclusivamente nas manifestações clínicas (em geral, percepção dos pais), do que quando se utilizam instrumentos diagnósticos mais objetivos, como o teste de desencadeamento alimentar oral.<sup>3-5</sup>

A história natural da APLV difere da observada para outras proteínas alimentares, que ocorrem em fases mais tardias da vida, por ser a primeira proteína estranha introduzida na alimentação de um organismo que ainda está em maturação do mecanismo de tolerância oral a proteínas heterólogas, portanto, mais propenso ao desenvolvimento de alergias alimentares.<sup>6</sup>

Assim, é preciso considerar a baixa especificidade dos sintomas no diagnóstico de APLV, pois também podem indicar outras doenças, como doença do refluxo gastroesofágico, diarreia infecciosa, alterações anatômicas, constipação orgânica etc.<sup>6</sup> Ademais, na perspectiva da medicina evolutiva, o consumo precoce de fórmula láctea impede o contato do tubo digestório com os agentes bioativos do leite materno, propiciando o desenvolvimento de sintomas.<sup>7</sup> Esses agentes contribuem para a maturação imunológica e integridade da mucosa intestinal (dificultando a ocorrência de APLV), e a maturação da função motora (dificultando o aparecimento de sintomas por imaturidade funcional).<sup>7,8</sup>

Atualmente, observa-se dificuldade no diagnóstico da APLV, com incidência reduzida ou elevada, resultando prejuízo para a nutrição da criança e para a qualidade de vida da família, especialmente nos diagnósticos errôneos.<sup>9</sup> Portanto, são necessários estudos que utilizem critérios mais apropriados e possam auxiliar o diagnóstico da APLV. Este estudo teve o objetivo de verificar a prevalência de APLV em crianças com sintomas atribuídos à ingestão do leite de vaca.

## Métodos

Foram convidados a participar da pesquisa pais de sessenta e seis crianças, referenciadas ao ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), com sintomas adversos relacionados à ingestão do leite de vaca pela criança ou pela mãe em amamentação ainda consumindo leite de vaca e derivados. Os sintomas eram cutâneos (dermatite atópica e urticária), respiratórios

(tosse e dispneia, rinites) e digestórios (regurgitação, vômitos, sangramento retal, constipação, diarreia e proctite). Constipação foi considerada quando a criança defecava duas ou menos vezes por semana com fezes endurecidas e

dor à defecação. O sangramento retal foi referido pelos pais como presença de sangue em qualquer quantidade, antes ou depois da defecação ou junto com as fezes. Proctite foi considerada ao exame físico pela presença de edema e eritema, com ou sem fissura, na região perianal ainda consumindo leite de vaca e seus derivados. O mesmo paciente poderia apresentar um ou mais sintomas gastrintestinais ou associação desses com sintomas cutâneos ou respiratórios. Foram excluídos pacientes com outras doenças do trato digestório, com alergia a múltiplas proteínas, com sintomas respiratórios e dermatite atópica, isolados em uso de antialérgicos, e prematuros de muito baixo peso.

Após assinatura do termo de consentimento livre esclarecido, foi aplicado um formulário estruturado, com dados da história individual, para avaliação de sintomas e sua relação com a exposição ao leite de vaca, registro de dados do exame físico, incluindo avaliação do estado nutricional e IgE total e específicas (anticaseína, anti  $\beta$ -lactoglobulinas e anti  $\alpha$ -lactoalbumina).

O estado nutricional foi avaliado com base na idade, peso e estatura conforme recomendado por Gibson<sup>9</sup>. O peso foi mensurado em uma balança digital (Filizola-Brasil), com a criança despida. O comprimento ou altura foi aferido com estadiômetro de bebê, nos menores de dois anos, e de parede, (Tonelli-Brasil) com a criança descalça, com coluna e membros inferiores retificados. Os índices antropométricos Peso/Idade, Altura/Idade foram calculados pelo programa Epi-Info versão 3.3.2, com base nos valores de referência do CDC 2000<sup>10</sup>. O valor do ponto de corte para baixo peso e baixa estatura foi o percentil menor de cinco.

O nível de IgE total e específicas foi determinado pelo UNIVERSAL 3g ALLERGY e IgE ESPECÍFICA IMMULITE 2000 3g, um imunoensaio por electroquimioluminescência com dois passos reacionais baseados numa tecnologia de fase líquida e em esferas revestidas. Considerou-se elevada a IgE total com níveis acima dos pontos de corte indicados pelas idades (RN até 1 mes: 6,1 UI/ml; 1- 2 meses: até 15UI/ml; 3 meses a 5 anos: até 60 UI/ml) e para IgE específicas o valor igual ou acima da classe III (3,5-17,5 KU/L).

O teste de desencadeamento alimentar oral aberto foi realizado para definir o diagnóstico de APLV: crianças, e mães quando ainda amamentando, foram orientadas para seguir uma dieta de exclusão do leite de vaca e derivados durante, pelo menos, duas semanas

utilizando fórmula de proteína isolada de soja. Todos os pacientes realizaram a dieta de exclusão pré-teste adequadamente. Havendo resolução dos sintomas, as crianças eram admitidas na enfermaria de Clínica Pediátrica do HC-UFPE, por vinte e quatro horas, para realização do teste de desencadeamento alimentar oral aberto modificado, de Isolauri & Hill<sup>11</sup>, Sampson<sup>12</sup> e Chapman<sup>13</sup>, da seguinte forma: 1 - Tempo0: aplicou-se cerca de 2 mL de leite de vaca na pele do antebraço esquerdo; 2 - Tempo 15': aplicou-se cerca de 2 mL de leite de vaca na região perioral; 3 - a partir do tempo 30', a cada 15 minutos, ofertou-se o leite de vaca gradativamente, em porções de 1%, 4%, 10%, 20%, 20%, 20% e 25% do volume total calculado (0,5g de proteína do leite de vaca sem lactose/kg), até o aparecimento de sintomas. O teste de desencadeamento foi suspenso sempre que o sintoma apresentado pelo paciente, referido pela família, antes do teste de desencadeamento, era reproduzido, incluindo-se o paciente no grupo APLV. Se os sintomas não apareciam durante a hospitalização, o paciente continuava a consumi-lo na quantidade habitual, pré-teste, 2 a 3 vezes por dia. Foi agendada uma visita semanal de retorno ao ambulatório para averiguar a presença de sintomas, até quatro semanas consecutivas. O paciente que desenvolvia o mesmo sintoma relatado, antes do teste de desencadeamento, durante o período de observação, foi incluído no grupo APLV, ao final de quatro semanas de observação; e o paciente que não apresentava sintomas foi incluído no grupo sem APLV. Não houve aparecimento de sintomas diferentes dos apresentados antes do teste. Esses foram contrarreferenciados para continuar a investigação, e os primeiros foram mantidos em acompanhamento, no ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do HC.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde CEP/CCS/UFPE) sob nº 197/06.

As informações obtidas dos formulários e dos exames complementares de 65 pacientes foram armazenadas (codificando-se as variáveis categóricas) em arquivo de dados, elaborado no programa de estatística Epi-Info, versão 3.3.2 for Windows, no qual foi realizada a análise estatística. A idade entre os grupos de comparação foram sumarizadas como medianas e comparadas pelo teste de Mann-Whitney. As diferenças entre as variáveis categóricas foram determinadas pelo teste de qui-quadrado. Os testes estatísticos foram considerados significantes quando o valor de  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

À admissão ao estudo, a idade dos pacientes foi de 5 meses ( $P_{25} = 2$  e  $P_{75}=9$  meses) no grupo APLV e de 7 meses(  $P_{25}= 4$  -  $P_{75} = 11$  meses) no grupo sem APLV (  $p=0,05$ ). Cerca de 50% dos pacientes com sintomas atribuídos à ingestão de leite de vaca não confirmaram APLV no teste de desencadeamento alimentar oral. Os pacientes relatavam inúmeros sintomas no momento da inclusão no estudo, na maioria dos casos; porém, no teste de desencadeamento alimentar oral, 24/35 pacientes positivaram com apenas um sintoma e 11/35 positivaram com dois sintomas. Reação tardia ocorreu em 77,1% (27/35) dos casos com teste positivo, sendo 18/27 na primeira, 3/27 na segunda e 6/27 na terceira semana de observação.

Conforme se observa na Tabela 1, encontrou-se associação estatisticamente significante entre manifestações cutâneas e teste de desencadeamento alimentar oral positivo. A presença de sintomas digestivos e respiratórios não se associou estatisticamente com a confirmação do diagnóstico de APLV.

A IgE total foi elevada em 17/35 pacientes (33,8%) do grupo APLV e em 5/30 (16,7%) pacientes do grupo sem APLV, mas as IgEs específicas foram elevadas apenas nos pacientes do grupo APLV: 3/35 (8,6%) para caseína, 3/35 (8,6%) para  $\alpha$ -lactoalbumina e 5/35 (14,2%) para  $\beta$ -lactoglobulina. Desses, dois apresentavam vômitos e baixo ganho de peso associados à urticária, com sintomas vagais (palidez e sudorese); em três pacientes, apenas, urticária. A Figura 1 descreve as proporções dos sinais e sintomas digestórios nos dois grupos.

## Discussão

Em quase metade (46,8%) das crianças com sintomas atribuídos à ingestão do leite de vaca, a APLV não foi confirmada pelo teste de desencadeamento alimentar oral. Os pacientes relatavam inúmeros sintomas no momento da inclusão no estudo; porém, no teste de desencadeamento alimentar oral, 24/35 pacientes positivaram com apenas um sintoma e 11/35 positivaram com dois sintomas, confirmando que as queixas relacionadas à ingestão de leite de vaca são excessivas. Esse resultado evidencia que, mesmo na presença de uma história clínica sugestiva de APLV, é preciso realizar investigação complementar com o teste de desencadeamento alimentar oral para confirmar o diagnóstico.<sup>6,15</sup> A predominância da APLV nos pacientes estudados ocorreu naqueles de menor idade, e a distribuição de frequência dos sintomas gastrintestinais, cutâneos e respiratórios foi semelhante às encontradas por Host.<sup>16</sup>

A APLV ocorre no organismo que não desenvolveu tolerância oral. Fatores envolvidos no estabelecimento da tolerância oral são genética, microbiota intestinal e idade do paciente, além de fatores associados aos antígenos.<sup>17</sup> No início da vida, a exposição a antígenos alimentares, apresentados ao sistema imune, ativa os linfócitos T reguladores, resultando supressão da resposta imune e indução da tolerância oral.<sup>18</sup> Esse processo ocorre, naturalmente, na maioria das crianças em aleitamento materno exclusivo, expondo sua mucosa intestinal às baixas doses de antígenos alimentares presentes no leite materno, que induzem supressão ativa de reações imunes pela secreção mucosa de fator de crescimento tecidual beta (TGF-beta).<sup>18</sup> No entanto, a permeabilidade intestinal aumentada possibilita o desenvolvimento de APLV, sobretudo quando há a oferta de proteína heteróloga.<sup>19</sup>

A criança em aleitamento artificial, além de estar em contato contínuo com proteínas estranhas numa fase de permeabilidade intestinal vulnerável, perde o benefício dos agentes bioativos do leite materno para proteção contra APLV.<sup>7</sup> O TGF-beta, citocina presente no leite materno, participa da produção de IgA pela mucosa intestinal e da supressão celular na resposta imune; níveis reduzidos propiciam sensibilização alérgica e APLV.<sup>20</sup>

A microbiota intestinal, adquirida no período pós-natal, também é necessária para o desenvolvimento de tolerância oral e expressão e função dos linfócitos T reguladores.<sup>21</sup> O aleitamento materno exclusivo é responsável pela colonização bacteriana pelo gênero bifidobactéria, que participa ativamente na tolerância oral.<sup>22</sup> Essas bactérias estão reduzidas nas crianças que usam fórmulas lácteas artificiais, favorecendo a ocorrência de APLV.<sup>22,23</sup>

Cerca de 50% dos pacientes com sintomas atribuídos à ingestão de leite de vaca não confirmaram APLV no teste de desencadeamento alimentar oral. Isso chama a atenção para o fato de que a presença de sintomas não implica, invariavelmente, a presença de doença, mas pode indicar um processo de maturação funcional em evolução, cabendo ao médico avaliar a interpretação dos pais e diferenciar entre saúde e doença.<sup>7,8,24</sup> É natural que os pais associem a presença de sintomas na criança de baixa idade à ingestão de leite de vaca, pois, na maioria dos casos, é o único ou o principal alimento consumido, em curtos intervalos de tempo. Sintomas podem depender do início precoce de fórmula láctea, que dificulta a maturação da função motora gastrintestinal decorrente da ausência do estímulo dos agentes bioativos do leite materno no organismo.<sup>7</sup> Dessa forma, sintomas no lactente saudável, possivelmente, não representam doença na maioria das situações e podem indicar um problema de desenvolvimento funcional imaturo, aliado ao consumo de fórmula láctea. Portanto, regurgitação pode decorrer do aumento do tempo de esvaziamento gástrico e maior intervalo

entre as mamadas, propiciado pelo uso de fórmulas lácteas; diarreia pode resultar de sobrecarga de solutos no preparo do leite artificial ou alimentação excessiva a curtos intervalos de tempo; dificuldade na defecação pode indicar incoordenação entre pressão intra-abdominal e relaxamento do assoalho pélvico nos primeiros meses de vida; constipação pode iniciar com a mudança de leite materno para fórmula láctea ou introdução de sólidos ou engrossantes do leite e, em nenhuma dessas situações, representa doença, mas imaturidade orgânica e/ou erro alimentar.<sup>24-27</sup>

Na prática, os exames laboratoriais (teste cutâneo, dosagem de IgEs) identificam apenas sensibilização pela positividade da IgE e possível reação imediata, mediada por IgE, sendo negativos nas crianças com sintomas gastrintestinais e provável reação tardia, mediada por células. O nível de IgE está associado à persistência à APLV, notadamente no mecanismo IgE mediado, e seguimento do paciente na marcha atópica, com duração prolongada das manifestações clínicas da APLV e aparecimento de outras manifestações alérgicas futuras.<sup>28,29</sup> A ausência de sintomas no curto prazo, ainda nos meses iniciais, indica maior probabilidade de desenvolvimento de tolerância oral clínica, mais comum nos mecanismos mediados por células.<sup>30</sup> Portanto, não se pode descartar que pacientes sintomáticos, de fato, apresentem APLV, porém de curta duração, enquanto a maturidade do sistema imune/tolerância oral não é alcançada.<sup>28</sup>

No período de dieta de exclusão de leite de vaca, os pacientes que não estavam em aleitamento materno exclusivo fizeram fórmula de proteína isolada de soja como substituto antes da realização do teste de desencadeamento alimentar oral. Apesar da literatura não recomendar o uso desse tipo de fórmula para crianças menores de 6 meses, com manifestações clínicas gastrintestinais, pelo risco do paciente também apresentar alergia à proteína da soja (10 a 14% dos casos). As situações clínicas referidas cursam com elevado grau de permeabilidade intestinal e gravidade de apresentação clínica, com comprometimento nutricional intenso (doença gastrintestinal eosinofílica, síndrome da enterocolite induzida por proteína alimentar, proctocolite alérgica), o que não foi o caso de nossos pacientes, que apresentavam sintomas isolados, sem inserção em nenhuma dessas situações clínicas específicas.<sup>6,31-33</sup> Conforme consta no Consenso Brasileiro de Alergia Alimentar, respaldado por sociedades médicas internacionais, essa formulação pode ser utilizada na condução de formas clínicas leves, mediadas por células.<sup>34</sup> O seguimento dos pacientes com teste de desencadeamento alimentar oral positivo que participaram deste estudo demonstrou resolução de sintomas, com evolução clínica favorável.

O teste de desencadeamento alimentar oral continua sendo a melhor forma para demonstrar relação causal entre antígenos alimentares e sintomas. Os resultados deste estudo corroboram a necessidade do teste de desencadeamento alimentar oral para determinar, com menor margem de erro, os pacientes que realmente têm APLV e que serão beneficiados com dieta de exclusão de leite de vaca.

## Referências

1. Host A. Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann Allergy Immunol.* 2002;89 (Suppl. 1): 33-7.
2. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: recent advance in pathophysiology and treatment. *Annual Rev Med.* 2009;60:261-77.
3. Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, Sigurdardottir ST, Lindner T, Goldhahn K, Dahlstrom J, McBride D, Madsen C. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:638-46.
4. Aardoom HA, Hirasing RA, Rona RJ, Sanavro FL, van den Heuvel EW, Leeuwenburg J. Food intolerance (food hypersensitivity) and chronic complaints in children: the parents' perception. *Eur J Ped.* 1997;156:110-2.
5. Zuberbier T, Edenharter G, Worm M, Ehlers I, Reimann S, Hantke T, Roehr CC, Bergmann KE, Niggemann B. Prevalence of adverse reactions to food in Germany: a population study. *Allergy.* 2004;59:338-45
6. Boyce JA, Arshad SH, Assa'ad A, Bahna SL, Beck LA, Burks AW, Byrd-Bredbenner C, Camargo AC, Luccioli S, McCall KM, Sampson HA, Scheneider LC, Simon RA, Simons FER, Teach SJ, Wood RA, Yawn BP. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy.2009.119p. Disponível em: <http://www3.niaid.nih.gov/topics/foodAllergy/clinical/Who/comments.htm>. Acesso: 30/03/2010.

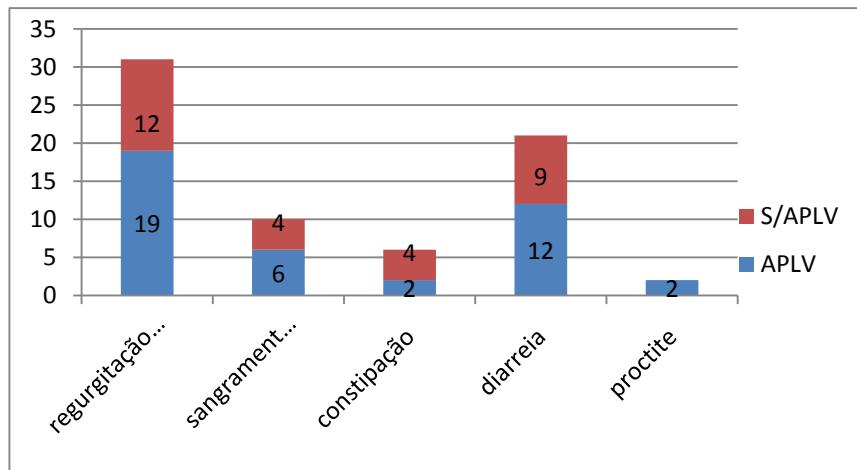
7. Goldman AS. Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective. *J Nutr.* 2000;130:426S-31S.
8. Udall JN, Colony P, Fritze L, Pang K, Trier JS, Walker WA. Development of gastrointestinal mucosal barrier. II. The effect of natural *versus* artificial feeding on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatr Res.* 1981;15:245-9.
9. Gupta RS, Kim JS, Barnathan JA, Amsden LB, Tumala LS, Holl JL. Food allergy knowledge, attitudes and beliefs: Focus groups of parents, physicians and the general public. *BMC Pediatr.* 2008;8:36.
10. Gibson RS. Evaluation of anthropometric indices, In: principles of nutritional assessment. New York: Oxford University. 1990. p.248-61.
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC – US). 2000 CDC growth charts: United States. Available in: [www.cdc.org/growthcharts](http://www.cdc.org/growthcharts).
12. Isolauri E, Hill DJ. Guide for paediatricians on the diagnosis and treatment of severe cow milk allergy and multiple food protein intolerance in infancy. Vieira, MC., Ispolidoro, JVN, Batista M, Toporoviski, M. Guia de diagnóstico e tratamento da alergia a proteína do leite de vaca. p. 21-24, 2004.
13. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:805-19.
14. Chapman JA, Bernstein IL, Lee RE. Food allergy: a practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2006; 96:S1-68.
15. Nowak-Wegrzyn A, Assa'ad AH, Bahna SL, Bock SA, Sicherer SH, Teuber SS, Adverse Reactions to Food Committee of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:S365-83.
16. Host A. Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy: some clinical, epidemiological and immunological aspects. *Pediatr Allergy Immunol.* 1994;5(suppl 6):5-36.

17. Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:3-12.
18. Peron JPS, Oliveira APL, Rizzo LV. It takes guts for tolerance: The phenomenon of oral tolerance and the regulation of autoimmune response. *Autoimmun Rev.* 2009;9:1-4.
19. Weaver LT, Laker MF, Nelson R. Intestinal permeability in the newborn. *Arch Dis Child.* 1984;59:236-41.
20. Kalliomäki M, Ouwehand A, Arvilommi H, Kero P, Isolauri E. Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:1251-7.
21. Ishikawa H, Tanaka K, Maeda Y, Aiba Y, Hata A, Tsuji NM, Koga Y, Matsumoto T. Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25+ CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol.* 2008;153:127-35.
22. Tannock GW. What immunologists should know about bacterial communities of the human bowel. *Semin Immunol.* 2007;19:94-105.
23. Björkstén B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy.* 1999;29:342-6.
24. Hyman PE, Milla PJ, Benninga MA, Davidson GP, Fleisher DF, Taminiau J. Childhood Functional Gastrointestinal Disorders: Neonate/Toddler. *Gastroenterology.* 2006;130:1519-26.
25. Issenman RM, Hewson S, Pirhonen D, Taylor W, Tirosh A. Are chronic digestive complaints the result of abnormal dietary patterns? Diet and digestive complaints in children at 22 and 40 months of age. *Am J Dis Child.* 1987;141:679-682.
26. Douglas PS. Excessive crying and gastro-oesophageal reflux disease in infants: misalignment of biology and culture. *Med Hypotheses.* 2005;64:887-98.

27. Heacock HJ, Jeffery HE, Baker JL, Page M. Influence of breast versus formula milk on physiological gastroesophageal reflux in healthy, newborn infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1992;14:41-6.
28. Shek LP, Soderstrom L, Ahlstedt S, Beyer K, Sampson HA. Determination of food specific IgE levels over time can predict the development of tolerance in cow's milk and hen's egg allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:387-91.
29. Jarvinen KM, Beyer K, Vila L, Chatchatee P, Busse PJ, Sampson HA. B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110:293-7.
30. Sicherer SH, Sampson HA. Cow's milk protein-specific IgE concentrations in two age groups of milk-allergic children and in children achieving clinical tolerance. *Clin Exp Allergy.* 1999;29:507-12.
31. Bhatia J, Greer F. Use of soy protein-based formulas in infant feeding. *Pediatrics.* 2008;121:1062-8.
32. Agostoni C, Axelsson I, Goulet O, Koletzko B, Michaelsen KG, Puntis J, Rieu D, Rigo J, Shamir R, Szajewska H, Turck D. Soy protein infant formulae and follow-on formulae: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;42:352-61.
33. National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health. NTP brief on soy infant formula. 2010. 47p. Disponível em: <http://ntp-server.niehs.nih.gov/?objectid=716A5EEB-F1F6-975E-781CA5472900FCAA>. Acesso em: 01/04/2010.

34. Solé D, Silva LR, Rosário Filho, NA, Sarni ROS, Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia. Consenso Brasileiro sobre alergia alimentar 2007. Rev Bras Alerg Imunopatol. 2008;31:65-89.

**Figura 1 – Sinais e sintomas do trato digestório dos pacientes com suspeita de alergia à proteína do leite de vaca (APLV) após teste de desencadeamento alimentar oral**



**Tabela 1 – Características demográficas e clínicas das crianças com sintomas suspeitos de alergia a proteínas do leite de vaca ( aplv) de acordo com a confirmação de APLV**

Pacientes	APLV				P
	Sim N=35	%	Não N=30	%	
	N		N		
<i>Sexo</i> <i>Feminino</i>	19	54,2	18	60,0	
<i>Estado nutricional</i> <i>Peso/Idade</i> $<P_{5.}$	7	20,0	6	46,2	0,75
<i>Altura/Idade</i> $<P_{5.}$	6	17,1	1	3,3	*
<i>Sintomas T. Digestório</i> <i>Sim</i>	25	71,4	22	73,3	0,91
<i>Respiratórios</i> <i>Sim</i>	7	20	9	30	0,52
<i>Cutâneos</i> <i>Sim-</i>	24	68,6	12	40,0	<b>0,04</b>

APLV :alergia à proteína do leite de vaca. S//APLV: sem alergia à proteína do leite de vaca

\*teste estatístico não realizado devido ao número insuficiente de pacientes para preencher um das caselas

*5 RESULTADOS*  
*ARTIGO ORIGINAL II*

---

## **Concentração sérica de Interferon- $\gamma$ e Interleucina-4 em crianças com suspeita de Alergia à proteína do leite de vaca**

**Introdução.** O papel das células  $T_{helper}$ , do tipo  $T_{h1}, T_{h2}$  na resposta imune, pela produção de citocinas, tem sido descrita e ampliada nos últimos anos. Comparar as concentrações de Interferon- $\gamma$  e Interleucina-4, no sangue periférico de crianças, com e sem alergia à proteína do leite de vaca, constituiu o objetivo deste estudo.

**Métodos.** Foram estudadas sessenta e quatro crianças (2-60 meses) com sintomas relacionados à alergia à proteína do leite de vaca (APLV). Aplicou-se um formulário estruturado com dados da história clínica, exame físico e de admissão ao estudo e evolução após teste de desencadeamento alimentar. Consideram-se com APLV as crianças que reproduziram os sintomas referidos antes do teste, e sem APLV aqueles que não apresentaram sintomas após o período de observação de quatro semanas após o teste. Os níveis séricos de Interleucina-4 e Interferon- $\gamma$  foram determinados pelo ELISA e as medidas summarizadas por medianas e comparadas entre grupos, com e sem alergia à proteína do leite de vaca, pelo teste de Mann-Whitney, com nível de significância  $p \leq 0,05$ . Foram construídos dois modelos de regressão linear múltipla usando as citocinas como variável dependente (um para a interleucina 4 e outro para o interferon-gama), idade e presença de APLV como variável independente.

**Resultados.** Em trinta e quatro crianças, mediana 5 meses, com alergia à proteína do leite de vaca, as concentrações de Interleucina-4 foram 2,66 pg/mL (1,56-4,19 pg/mL) e 3,06 pg/mL (1,93-5,12 pg/mL) nos sem alergia ( $p=0,30$ ). A idade maior de 6 meses esteve associada à maior concentração de interleucina 4 e explicou 7% da sua variação ( $r^2$  ajustado = 0,07;  $p < 0,05$ ). O efeito foi independente da presença de APLV. No entanto, a interação entre idade maior de 6 meses não contribuiu para o aumento do interferon-gama.

**Conclusões.** Neste estudo, as concentrações de Interleucina-4 e do Interferon- $\gamma$  foram semelhantes entre os grupos com e sem APLV.

**Palavras-chave:** hipersensibilidade a leite, lactentes, interleucina-4, interferon- $\gamma$ .

## **INTRODUÇÃO**

Alergia é uma reação de hipersensibilidade de mecanismo imunológico com a produção de anticorpos específicos ou mediado por células. O termo hipersensibilidade descreve sinais e sintomas reproduzíveis à exposição de determinado estímulo numa dose tolerada por indivíduos normais (JOHANSON; BIEBER; DAHL et al, 2003).

A alergia à proteína do leite de vaca (APLV) é uma causa importante de morbidade na infância e, com frequência, a primeira manifestação da doença alérgica. Os mecanismos envolvidos na APLV ainda não estão completamente esclarecidos (WEGRYN; SAMPSON, 2006); (NIGGEMNN; BEYER, 2007); (AHERENS et al. 2008); (SICHERER; SAMPSON, 2009). A APLV é relacionada principalmente com reações cutâneas (eczema atópico e urticária), respiratórios (asma, rinite) e digestórios, como vômitos, regurgitações, diarreia, e constipação (VANDEPLAS et al, 2009).

O estímulo antigênico, no conceito atual das reações de hipersensibilidade, centralizado na presença da IgE, traduz, pela produção e concentração de interleucina-4(IL-4), as reações do tipo imediata, na presença de baixas concentrações do interferon-gama (INF- $\gamma$ ) (MORATO et al, 2003); (WATAUGA; ISOLAURI, 2004). Entretanto, devido ao balanço imunológico dominante na vida intra uterina, o tipo Th2 é universal no início da vida. Portanto, uma superposição na concentração de interleucina-4, principal citocina TH2, e anticorpos IgE prevalece entre atópicos e não atópicos (PRESCOTT et al, 1999) no início da vida no entanto outros autores referem o desbalanço na produção e liberação dessas duas citocinas, com aumento da Interleucina-4, foi relacionado com atopia e síndrome da hiper IgE (ABRAHAN; OWNBY, 2005) e o Interferony sinaliza o estado de tolerância oral (SCOTT-TAYLOR et al, 2005); (TURCANU; SHOEILA; GIDEON, 2003); CHEHADE; MAYER, 2005).

A maioria das pesquisas, entretanto, tem observado que os indivíduos o em indivíduos predispostos a produzir grande quantidade de IgE e apresentam reações do tipo imediatas decorrente da maior produção de Interleucina-4 (SCOTT-TAYLOR et al, 2005); (ANDRE; PÊNE; ANDRÉ, 1996).

Na criança com APLV, a produção de citocinas modifica-se com o tempo, acompanhando as maturidades orgânica, imunológica e funcional e podem ser liberadas por outros fenômenos além das respostas imunológicas adaptativas aos antígenos do leite de vaca. O objetivo deste estudo foi comparar as concentrações séricas do Interferon- $\gamma$  e da interleucina-4 entre crianças com e sem APLV.

## Pacientes e Métodos

Pais de sessenta e cinco crianças, referenciadas ao ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), no período de maio de 2007 a outubro de 2008, com sintomas cutâneos (dermatite atópica, urticária), do trato respiratório (tosse, dispneia, rinites) e digestório, atribuídas à ingestão do leite de vaca, foram convidados a participar da pesquisa. Após assinatura do termo de consentimento livre esclarecido, foi aplicado um formulário estruturado com dados da história clínica para avaliação de sintomas relacionados à exposição ao leite de vaca, registro de dados do exame físico de admissão e evolução, após teste de desencadeamento alimentar oral e exames complementares colhidos na admissão do estudo: IgE total e específicas para (caseína,  $\beta$ -lactoglobulinas e  $\alpha$ -lactoalbumina), interferon- $\gamma$  e interleucina-4.

Foram excluídos da pesquisa os pacientes que já estavam em dieta de isenção do leite de vaca e derivados, com sintomas suspeitos de alergia a múltiplas proteínas, portadores de outras doenças conhecidas do trato digestório, com sintomas respiratórios e dermatite atópica isolados, em uso de antialérgicos, e prematuros de muito baixo peso ao nascimento.

Os pacientes foram alocados nos grupos para comparação após o teste de desencadeamento alimentar oral da seguinte forma: no grupo com APLV, incluíram-se as crianças que reproduziram os sintomas referidos antes do teste; no grupo sem APLV, aqueles que não apresentaram sintomas após o período de observação do teste.

### Determinação da IgE total e específicas

O nível de IgE total e específicas foi determinado pelo UNIVERSAL 3g ALLERGY e IgE ESPECÍFICA IMMULITE 2000 3g, por electroquimioluminescência, e considerou-se elevado para IgE específicas o valor predeterminado igual ou acima da classe III (3,5-17,5 KU/L) segundo a classificação do fabricante.

### Determinação das citocinas

A Interleucina-4 e Interferon- $\gamma$  foram aferidas com o kit QUANTIKINE<sup>®</sup> HS ( HIGH SENSITIVITY ELISAs) HUMAN Interleucina-4 IMMUNOASSAY, E HUMAN INF- $\gamma$  para determinação quantitativa de Interleucina-4 e Interferon- $\gamma$  pela técnica ELISA, de

acordo com as instruções do fabricante (R&D SYSTEMS, MINNEAPOLIS, MN55413 USA). As citocinas foram expressas como variáveis contínuas, em pg/mL

### **Teste de desencadeamento alimentar oral**

O teste de desencadeamento alimentar oral para proteína do leite de vaca foi realizado após a coleta dos exames complementares: crianças, e mães quando ainda amamentando, foram orientadas para seguirem uma dieta de exclusão do leite de vaca e derivados durante, pelo menos, duas semanas. Havendo resolução dos sintomas, as crianças eram reexaminadas e, se em bom estado clínico, admitidas à enfermaria de Clínica Pediátrica do HC-UFPE, por vinte e quatro horas, para realização do teste de desencadeamento alimentar oral aberto modificado, de Isolauri & Hill<sup>18</sup>, Sampson<sup>1</sup> e Chapman<sup>20</sup>.

Calculou-se a dose 0,5g/Kg de proteína do leite de vaca em fórmula láctea sem lactose e procedeu-se da seguinte forma:

(1) tempo 0: aplicou-se com gaze cerca de 2 mL de leite de vaca na pele do antebraço esquerdo;

2) tempo 15': aplicou-se com gaze cerca de 2 mL de leite de vaca nos lábios;

3) a partir do tempo 30', a cada 15 minutos, ofertou-se o leite de vaca gradativamente, em porções de 1%, 4%, 10%, 20%, 20% e 25% do volume total calculado. Se, em algum momento da aplicação ou ingestão do leite de vaca, ocorria o aparecimento dos sintomas referidos, antes do teste de desencadeamento, o teste era imediatamente interrompido, efetuadas as medidas de suporte necessárias, e a criança classificada no grupo com APLV.

Se os sintomas não se reproduziam durante o internamento, o paciente recebia alta com orientação de continuar a consumir o leite de vaca, na quantidade habitual, pré-teste, 2 a 3 vezes por dia, com reavaliações semanais agendadas e com livre acesso ao pesquisador e ao serviço a qualquer momento em que o sintoma ocorresse dentro de quatro semanas subsequentes à alta hospitalar.

Se os sintomas referidos antes do teste apareciam durante o período de observação de quatro semanas, o paciente era incluído no grupo com APLV. Os pacientes que não reproduziram os sintomas até o final desse período foram incluídos no grupo sem APLV, e foram contrarreferenciados para continuar a investigação dos sintomas.

Não houve aparecimento de sintomas diferentes dos relatados antes do teste. Os pacientes com APLV foram mantidos em acompanhamento no ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do HC. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde CEP/CCS/ UFPE) Reg. n.197/06.

### **Análise estatística**

Uma criança foi retirada da análise por perda de material biológico. As informações obtidas dos formulários e dos exames complementares de 64 pacientes foram armazenadas (codificando-se as variáveis categóricas) em arquivo de dados elaborado no programa de estatística Epi-Info, versão 3.3.2 for Windows, no qual foi realizada a análise estatística. Foram analisados os níveis de citocinas entre os grupos com e sem APLV. Os resultados foram sumarizados como medianas e comparados pelo teste de Mann-Whitney. Os testes estatísticos foram considerados significantes quando o valor de  $p \leq 0,05$ . Foram construídos dois modelos de regressão linear múltipla usando as citocinas como variável dependente (um para a Interleucina-4 e outro para o Interferon- $\gamma$ ), idade e presença de APLV como variável independente. As variáveis contínuas (citocinas) foram transformadas em logaritmo para assegurar o pressuposto de normalidade para a realização da regressão linear múltipla. Os modelos foram baseados no procedimento ENTER. Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico SPSS para Windows, versão 8.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

### **Resultados**

A tabela 1 apresenta a caracterização dos pacientes estudados quanto às variáveis demográficas e sintomas presentes nos grupos com e sem APLV. Os pacientes com sintomas cutâneos foram confirmados, na maioria com teste de desencadeamento alimentar oral positivo, com diferença estatística significante. A IgE total foi positiva em 17/35 pacientes (33,8%) do grupo APLV e em 5/30 (16,7%) pacientes do grupo sem APLV, mas as IgEs específicas foram elevadas apenas nos pacientes do grupo APLV: 3/35 (8,6%) para caseína, 3/35 (8,6%) para  $\alpha$ -lactoalbumina e 5/35 (14,2%) para  $\beta$ -lactoglobulina. Desses, dois apresentavam vômitos e baixo ganho de peso associados à urticária, com sintomas vagais (palidez e sudorese); em três pacientes, apenas, urticária. As concentrações séricas de

Interferon- $\gamma$  e Interleucina-4 não apresentaram diferença estatística significante entre os grupos com e sem APLV, (tabela 2).

A Tabela 3 demonstra o modelo de regressão linear múltipla para a interleucina 4 e o interferon-gama. A idade maior de 6 meses foi fator contribuinte para o aumento da interleucina-4 e explicou 7% da sua variação ( $r^2$  ajustado = 0,07;  $p < 0,05$ ). O efeito foi independente da presença de APLV. No entanto não houve relação da idade e alergia à proteína do leite de vaca com as concentrações de Interleucina-4 e do Interferon- $\gamma$ . As concentrações de Interferon- $\gamma$ , provavelmente, traduziram o alcance da tolerância em alguns pacientes, anteriormente com APLV, ou as reações tardias predominantes. Um percentual de crianças acima de seis meses com fenótipo atópico poderia explicar, em parte, as concentrações de Interleucina-4 mais elevadas nessa faixa etária.

## Discussão

Neste estudo, não houve diferença entre as concentrações séricas da Interleucina-4 e do Interferon- $\gamma$  porque a maioria dos pacientes apresentou reações do tipo tardia, em que ocorre aumento de Interferon- $\gamma$  e baixa produção e liberação da Interleucina-4, citocina sinalizadora das reações imediatas.

É possível que algumas crianças tenham evoluído para o estado de tolerância oral, entre o período de admissão ao estudo e a realização do teste de desencadeamento alimentar oral, expressando as concentrações de Interferon- $\gamma$  semelhantes às dos pacientes do grupo sem APLV. Diante desse resultado, especulou-se o efeito das idades e produção dessas citocinas, independente da APLV. A Interleucina- 4 mais elevada em crianças maiores de seis meses pode indicar tanto indivíduos que não desenvolveram tolerância à proteína ao leite de vaca como o padrão normal de crianças no inicio da vida. As crianças menores de 6 meses, com sintomas de APLV, na maioria, parece terem maior chance de desenvolver tolerância oral em curto prazo.

A competência funcional do sistema imunológico, pela produção de Interferon- $\gamma$  e Interleucina-4, nas respostas inflamatórias alérgicas, tem sido identificada nos últimos vinte anos por vários pesquisadores independentes (SCOTT-TAYLOR et al, 2005); (TURCANU; SHOEILA; GIDEON, 2003); (CHEHADE; MAYER, L.2005); (BEYER et al, 2002); (PEREZ- MACHADO et al, 2003).

Os estudos indicam que uma capacidade reduzida para produzir Interferon- $\gamma$ , durante o período pós-natal, caracteriza crianças predispostas a desenvolverem alergia, mas os mecanismos que fundamentam essa associação ainda não foram completamente esclarecidos (BURKS; LAUBACH; JONES, 2008). É evidente que essa fase da vida representa o período no qual ocorre o desenvolvimento de memórias alérgeno específicas pelas células T *helper* ( $T_h$ ), com a manutenção da produção de Interleucina-4 nas crianças geneticamente predispostas a alergias (ABBAS, 2007); (BEYER; TELBER, 2004). Para esses pacientes, a combinação do genótipo com variados gatilhos ambientais a que são submetidos no início da vida pós-natal é que determinará, de fato, o fenótipo da criança com APLV. Enquanto as concentrações de Interferon- $\gamma$  indicam o estado de organização imunológica para a resposta supressora ao enfrentamento com as proteínas estranhas, indicando que o indivíduo nunca foi alérgico ou, se já foi, atingiu o estado de tolerância oral (STROBEL; MOWAT, 1998).

Na criança, estímulos de outras naturezas, diferentes dos抗ígenos presentes no leite de vaca, provocam respostas inflamatórias com produção e liberação de citocinas. Tem sido descrito um número crescente de proteínas que inibem suas atividades biológicas ao se ligarem diretamente a um receptor de citocinas, e falham na ativação celular, ou se ligam diretamente a elas, inibindo suas atividades. Alguns vírus desenvolvem estratégias anticitocinas e interferem na sinalização intracelular, seja na secreção de citocinas, seja na indução de inibidores de citocinas nas células dos hospedeiros (KINDT, 2008).

Assim, crianças na vida pós-natal estão vulneráveis a modificações no padrão dos seus mecanismos de defesa pela exposição ao ambiental até mesmo em ações preventivas como a vacinações, nos primeiros dois anos de vida. As respostas vacinas-específicas e a produção de citocinas foram recentemente verificadas em uma série de experimentos (KOGUSKA et al, 2009); (ROWE et al, 2000) HOLT et al, 2000); (BIGGELAAR et al, 2009); (KOGUSKA et al, 2009) e, coletivamente, os estudos sugerem uma hiporesponsividade das respostas adaptativas durante os primeiros 6-12 meses de vida, com aumento da produção de Interferon- $\gamma$ , em fases mais tardias da vida, como parte do imunofenótipo do paciente atópico.

No contexto das doenças alérgicas, demonstra-se que o Interferon- $\gamma$  desempenha um papel central no processo inflamatório lesional da dermatite atópica e na inflamação de vias aéreas em animais-modelo na asma (SUTAS; KERKI; ISOLAURI, 2000); (KOGUSKA et al, 2009). Na patogênese da doença atópica, o Interferon- $\gamma$  antagoniza o processo da doença pela limitação da resposta  $T_{H2}$  pelas células de memória, mas uma vez que ocorre a sensibilização,

estabelece-se uma coexpressão na imunidade do tipo tardio, nos locais das lesões, que amplificam a resposta inflamatória tecidual e contribuem com a persistência e gravidade da doença.

Os estudos sobre citocinas, particularmente quanto ao Interferon- $\gamma$  e Interleucina-4, demonstram resultados conflitantes nas reações alérgicas APLV (TURCANU; SHOEILA; GIDEON, 2003); (PAAJANEN et al, 2005); (VERES et al, 2003); (WALKER-SMITH, 2003). Em parte, essas irregularidades são explicadas pelas dificuldades operacionais na mensuração e interpretação das concentrações pelas exigências no controle de vários itens que se estendem desde o local de coleta (sangue periférico ou mucosas), tempo de coleta, fase de atividade das reações, até a uniformidade de características específicas do hospedeiro, grupos controles e tipos de antígenos.

A extração dos mecanismos das reações alérgicas a outros tipos de proteínas estranhas e populações para crianças com APLV é inadequada para efeito comparativo. As reações a outras proteínas ocorrem em fases mais tardias da vida, quando boa parte dos pacientes já alcançaram a tolerância ao leite de vaca e são sensibilizados a outros antígenos ambientais ou alimentares.

O efeito contrarregulatório do Interferon- $\gamma$  sobre a produção e liberação de Interleucina-4 tem sido demonstrado, na maioria das pesquisas, em populações de atópicos selecionados (WATAUGA; ISOLAURI, 2004); (TURCANU; SHOEILA; GIDEON, 2003); (SUTAS; KERKI; ISOLAURI, 2000) produzindo IgE. Alguns sugerem a utilização da medida dessas concentrações de citocinas como ferramenta auxiliar em testes de desencadeamento alimentar oral (WATAUGA; ISOLAURI, 2004); (TURCANU; SHOEILA; GIDEON, 2003).

Ocorre que a maioria das crianças com APLV apresenta reações do tipo tardio e desenvolve o estado de tolerância aos antígenos presentes no leite de vaca, ou tolerância oral até os três anos de idade (ABRAHAN; OWNBY, 2005); (CHEHADE; MAYER, 2005); (STROBEL; MOWAT, 1998); (KINDT, 2008). A inativação de uma resposta imune devido à tolerância não resulta em uma supressão geral do sistema imune, mas, sim, é específica para o antígeno tolerogênico, que é alcançado em diferentes momentos individuais. O potencial de tolerância às proteínas do leite de vaca, demonstrado pelo teste de desencadeamento alimentar oral, em estudos populacionais, foi em torno de 27.3% aos seis meses, 63,6% aos 10 meses e 72,75 aos 14 meses (HILL et al, 1993).

O desenvolvimento dos mecanismos da tolerância oral, no período após o nascimento, pelo menos em parte, depende da microbiota, que, em interação com a imunidade inata, determina o tipo de respostas aos抗ígenos. Pode-se supor, que a identificação desses mecanismos moleculares específicos e o entendimento de como e quando se processa a ativação da modulação sinalizadora das citocinas, em direção à diferenciação e a função, em condições normais e patológicas no organismo, é que precisam ser determinados (HILL et al, 2003); (WALKER SMITH, 2003). Mais uma vez a maturidade imunológica fica demonstrada como elo importante do fenômeno biológico complexo da APLV, cuja classificação por uma qualidade que não possui (“reação não-IgE mediada”) (JOHANSON; BIEBER; DAHL et al, 2004) não se mostrou esclarecedora, até agora. Nessa lógica, pacientes predispostos a produzirem IgE com reações do tipo imediata, atópicos, com anafilaxia, asma e urticárias, produzem níveis mais elevados de IgE. Neste estudo é provável que a manutenção elevada da IL-4 das crianças com mais de seis meses esteja representando um contingente daquelas que seguirão na *marcha alérgica*, superposto ao comportamento fisiológico dessa fase de vida (PRESCOTT et al, 1999).

Nos primeiros meses de vida, a presença de outros processos adaptativos da vida pós-natal fazem reações imunes de maneira similar às observadas ao enfrentamento com primeiro alimento introduzido na dieta, que é, em geral o leite de vaca e, assim, muitas crianças são classificadas, inadvertidamente, com alergia por uma associação equivocada e isso sempre deve ser cuidadosamente verificado (WALKER-SMITH, 2003); (CALDER et al, 2006).

Embora os testes de desencadeamento alimentar oral cuidadoso promovam um grau de confiabilidade quanto à presença de APLV, temos que admitir que, em crianças com APLV e reações do tipo tardio, é possível a ocorrência de resultados falsos negativos, que ocorre também mesmo em testes duplo-cego controlados por placebo. Isso, certamente, poderia comprometer a comparação entre os grupos, mas o tempo de observação neste estudo de quatro semanas é considerado, na literatura, adequado para reações tardias (JOHANSON et al, 2004); (WANG et al, 2007).

Neste estudo, as concentrações de Interleucina-4 e do Interferon- $\gamma$  foram semelhantes entre os grupos com e sem APLV. As concentrações de Interferon- $\gamma$ , provavelmente, traduziram o alcance da tolerância em alguns pacientes, anteriormente com APLV, ou as reações tardias predominantes. Um percentual de crianças acima de seis meses com concentrações de Interleucina-4 mais elevadas estaria representando as crianças atópicas.

**Referências**

- ABBAS, A. M.; LICHTMAN, A. M. **Imunologia Básica**. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier. 2007.
- ABRAHAN, C. M.; OWNBY, D. R. Ontogeny of the allergic inflammatory response. **Immunol Allergy Clin North Am.**, v. 25, n. 2, p. 215-29, 2005.
- AHERENS, B. et al. Differential diagnosis of food-induced symptoms **Pediatr Allergy Immunol.** 19, 92-96, 2008.
- ANDRÉ, F.; PÊNE, J.; ANDRÉ, C. Interleukine-4 e interferon  $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells from food allergic patients. **Allergy**, v. 51, p.350-5, 1996.
- BEYER K., TEUBER, S. The mechanism of food allergy: what do we know today? **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 4, n. 3, p. 197-9, 2004.
- BURKS, W.; LAUBACH, S.; JONES, S. M. Oral tolerance, food allergy and immunotherapy; implications for future treatment. **J Allergy Clin Immunol**, v.121, p.1344-1350, 2008.
- CALDER, P. C. et al. Early nutrition and immunity – progress and perspectives. **British Journal of Nutrition**, v. 9, n.4, p. 774-790, 2006.
- CHAPMAN, J. A.; BERNSTEIN, I.L.; LEE, R. E. Food Allergy: a practice parameter. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 96, 1-68, 2006. Supplement.
- CHEHADE, M.; MAYER, L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. **J Allergy Clin Immunol**, v.115, p.3-12, jan. 2005.
- EIGENMANN, P.A.; FROSSARD C. P. The T lymphocyte in food-allergy disorders. **Curr Opin Allergy Immunol**, v. 3, p. 199-203, 2003.
- HOLT, P. G. et al. Development of immunologic memory against tetanus toxoid and pertactin antigens from diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in atopic versus non-atopic children. **J Allergy Clin Immunol**, v.105, p.1117-22, 2000.
- HILL, A. et al. Natural history of cow's milk allergy: immunological outcome over 2 years. **Clin. Exp Allergy**, p. 124-31, 1993.
- ISOLARI, E.; HILL, D. J. Guide for paediatricians on the diagnosis and treatment of severe cow milk allergy and multiple food protein intolerance in infancy. VIEIRA, M. C. et al. Guia de diagnóstico e tratamento da alergia a proteína do leite de vaca. p. 21-24, 2004.

JOHANSON, S. G. et al. Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy organization, October 2003. **J Allergy Clin Immunol**, v. 113, p.102-106, 2004.

JONATHAN, E. T.; WALKER, W. A. The development of mucosal immunity **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, p. 1273-1278, 2005.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. **Imunologia de Kuby**. 6. ed. Porto Alegre: Art Med, p. 331-339, 2008.

KROGUSKA, A. et al. Cytokine profile in children with asthma undergoing food challenges. **J Investig Allergol Clin Immunol**, v. 19 , n.1, p. 43-48, 2009.

MARCIORKOWSKA, E.; PANASIU, A.; KACZMARCHKI, M. Concentrations of mucosal cytokines in children with food allergy and Helicobacter pylori infection. 2005, **World Journal of Gastroenterology**, v.11, n. 43, p. 6751-6756, 2005.

MORATO, V. et al. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential  $T_H$  2- $T_H$ 1 in C3h/He and BALB/c mice's Allergy. v. 111, p. 1122-8, 2003.

MURCH, S. H. The immunologic basis for intestinal food allergy. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 16, p. 552-557, 2000.

NIGGEMANN, B.; BEYER, K. Diagnosis of food allergy in children: Toward standardizations of food challenge. **JPGN**, 45, p. 399-404, 2007.

PAAJANEN, L. et al. Increased. INF- $\gamma$  secretion from duodenal biopsy samples in delayed-type cow's milk allergy. **Pediatric Allergy and Immunology**, v.16, p. 439-444, 2005.

PÉREZ-MACHADO, M. T. et al. Spontaneous Th1 cytokine production by intraepithelial but not circulating cells in infants with or without food allergies **Allergy**, v.59, p.346-353, 2004.

PREScott, S. L. et al Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. **Lancet**, v. 353, p.196-200, 1999.

SAMPSON, H.A. Update on food allergy. **J Allergy Clin Immunol**.v.113, p. 805-810, 2004.

SCOTT-TAYLOR, C. et al. Patterns of food-specific cytokine production by lymphocytes of children with multiple allergies. **Clin Exp Allergy**, v.35, p.1431-1480, 2005.

SICHERER, S. H., SAMPSON, A.H. Food allergy: Recent advances in Pathophysiology and treatment. **Annu Rev. Med**, 60, 261-77, 2009.

SUOMALAIEN, H.; SÖPP, E.; ISOLAURI, E. Immunologic disturbances in cow's Milk allergy, 1: delayed maturation of suppressor activity. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 4, p. 196-202, 1993.

SUTAS, Y.; KERK, O. M.; ISOLAURI, E. Late onset reactions of oral food challenge are linked to low serum interleukin-10 concentrations in patients with atopic dermatitis and food allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30 p. 1121-1128, 2000.

VAN DEN BIGGELAAR, A. H. J. Neonatal innate cytokine responses to BCG controlling T-cell development vary between populations. **J Allergy Clin Immunol**, v.124, n.3, p.544-50, 2009.

VERES, G. et al. Citokines and adhesion molecules in duodenal mucosa of children with delayed -type food allergy. **Journal of Gastroenterology and Nutrition**, v. 37, p. 27-34, 2003.

TURCANU, V.; SHOEILA, J. J. M.; LACK, G. Characterization of lymphocytes responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. **J. Clin Invest**, v.111, p. 1065-1072, 2003.

WALKER-SMITH, J. Cow's milkallergy: a new understanding from immunology. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 90, n. 3, p. 81-83, 2003. Supplement.

WEGRYN, A. N, SAMPSON, H. A. Adverse reaction to foods. **Med Clin N Am**, v. 90, p. 97-127, 2006.

WANG, Y. et al. Potential non-immunoglobulin E- mediated food allergies: Comparison of open challenge and double-blind placebo-controlled food challenge. **Otolaryngology-Head and Neck Sugery**, v. 137, p. 803-809, 2007.

WATAUGA, S.; ISOLAURI, E. Cow's milk allergy in infants with atopic eczema is associated with aberrant production of interleukine-4 during oral cow's milk challenge. **J Pediatric Gastroenterol Nutr**, v. 39, p. 529-35, 2004.

WEGRYN, A. N.; SAMPSON, H. A. Adverse reaction to foods. **Med Clin N Am**, v. 90, p. 97-127, 2006.

**TABELA 1 – Caracterização dos pacientes com e sem APLV de acordo com o teste de desencadeamento alimentar oral**

<i>Pacientes</i>	<i>APLV</i>				<i>p</i>
	<i>Sim</i> <i>N=34</i>	<i>%</i>	<i>Não</i> <i>N=30</i>	<i>%</i>	
	<i>N</i>		<i>N</i>	<i>%</i>	<i>p</i>
<i>Sexo Feminino</i>	19	54,2	18	60,0	
<i>Estado nutricional</i> <i>Peso/Idade</i> <i>&lt;P<sub>5</sub></i>	7	20,0	6	46,2	0,75
<i>Sintomas T. Digestório</i>	25	71,4	22	73,3	0,91
<i>Respiratórios</i>	7	20	9	30	0,52
<i>Cutâneos</i>	24	68,6	12	40,0	<b>0,04</b>

APLV: alergia à proteína do leite de vaca

**TABELA 2 – Concentrações séricas de interleucina-quatro( IL-4 )e interferon gama (INF- $\gamma$ ) de acordo com a presença de alergia à proteína do leite de vaca (APLV)**

<i>Citocinas</i>	<i>APLV</i> <i>N=34</i>	<i>S/ APLV</i> <i>N=30</i>	<i>p</i>
			<i>p=0,29</i>
<b>IL-4(pg/ml)</b>	2,66(1,56-4,19)	3,06(1,93-5,12)	
<b>INF-<math>\gamma</math>(pg/ml)</b>	115,96(69,27-150,6)	97,88(73,3-174,69)	<i>p=0,86</i>

APLV: com alergia à proteína do leite de vaca. S/APLV:sem alergia à proteína do leite de vaca.

Nota: valores expressos em mediana ( percentil25 e 75)

**TABELA 3 – Regressão linear múltipla dos fatores contribuintes para citocinas**

Variável dependente	Variáveis independentes	$\beta$ [IC]	p
IL-4 (pg/ml)	Idade ( $\geq$ seis meses)	1,63 [1,10-2,42]	0,02
	APLV (sim)	0,97 [0,65-1,43]	0,85
INF- $\gamma$ (pg/ml)	Idade ( $\geq$ 6 meses)	1,42 [0,11-2,24]	0,13
	APLV (sim)	1,22 [1,39-1,92]	0,40

$\beta$ :coeficiente de regressão não padronizado

Categorias de referência: idade< 6 meses; APLV: alergia à proteína do leite de vaca; IL-4 :nível sérico de interleucina-4, INF- $\gamma$ : nível sérico de interferon- $\gamma$

Nível de significância: p  $\leq$ 0,05

## ***6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES***

---

## 6 Considerações finais e Recomendações

---

---

A elaboração e execução deste projeto de pesquisa buscavam responder a dúvidas relacionadas ao diagnóstico da alergia à proteína do leite de vaca em pacientes encaminhados aos ambulatórios de gastroenterologia pediátrica do Recife. Atendia, assim, a uma necessidade de estudar aspectos clínicos e laboratoriais de uma população crescente de crianças com sintomas relacionados à ingestão do leite de vaca em dietas de isenção com solicitações de fórmulas especiais, para tratamento de alergia à proteína do leite de vaca, provavelmente nem sempre necessário, como ocorre em vários outros estados do Brasil.

A pesquisa foi planejada, inicialmente, para ser um estudo exploratório das concentrações séricas de INF- $\gamma$  e IL-4, em crianças supostamente com alergia à proteína do leite de vaca (APLV), para verificar, nesses pacientes, se havia diferença dessas citocinas em crianças com e sem APLV, tema do segundo artigo original. Para análise dessas citocinas, foi necessária a realização do teste de desencadeamento alimentar oral para agrupar os pacientes com e sem APLV. Os dados evidenciaram:

1. padrão indiferenciado das concentrações de interferon gama e IL-4 entre os pacientes classificados pelo teste de desencadeamento alimentar oral, com e sem alergia à proteína do leite de vaca;

2. diferença significante dos níveis de IL-4 entre pacientes maiores de seis meses, indicando uma possível interferência do desenvolvimento imune da capacidade de fazer memórias da resposta imune adaptativa em alguns pacientes. Esse resultado pode assinalar que esses pacientes não desenvolveram tolerância oral à proteína do leite de vaca.

3. concentrações de INF- $\gamma$  eram semelhantes entre as crianças maiores e menores de seis meses, pelo predomínio de reações tardias nos pacientes com alergia à proteína do leite de vaca ou em sinalização ou indício da aquisição da tolerância oral.

A principal *limitação* do estudo foi atingir o número de pacientes, estimado no cronograma do projeto da pesquisa para o estudo de citocina, quarenta em cada grupo, porque a maioria já estava em dieta de isenção, quando encaminhada aos ambulatórios especializados.

Os resultados deste estudo permitiram:

1. especular sobre a interferência do desenvolvimento imunológico e do possível papel da imunidade inata na criança de baixa idade, para explicar o comportamento diferenciado da APLV, em relação às outras reações de hipersensibilidade alimentar, em crianças mais velhas e em adultos;

2. observar que as concentrações de INF $\gamma$  e IL-4, no sangue periférico de pacientes com APLV, não foram capazes de identificar o mecanismo imunológico sob os sintomas no grupo estudado;

3. conferir maior importância ao estado imunológico individual do que às propriedades antigênicas do leite.

Esses conhecimentos reforçam a necessidade de individualizar o diagnóstico em cada paciente e acompanhá-lo até que se estabeleça a tolerância oral, porque o diagnóstico da APLV, em crianças, só é possível sob o olhar retrospectivo de sua evolução, em que cada paciente tem o seu próprio ritmo. Confirmamos as limitações do diagnóstico com base em sintomas. Nesse contexto, recomendamos:

1. verificar, em primeiro lugar, se o sintoma está relacionado a uma doença, seguir um modelo biopsicossocial na abordagem preliminar da criança com sintomas suspeitos de APLV;

2. analisar, para cada paciente, a necessidade de exames complementares;

3. a realização do teste de desencadeamento alimentar oral em todo paciente com suspeita de APLV antes de prescrever dietas especiais.

### **Sugestões de estudos futuros**

1. Avaliação da imunidade inata em crianças no primeiro ano de vida, direcionadas à resposta inflamatória alérgica;
2. estudos de prevalência baseados no teste de desencadeamento alimentar oral em diversas regiões do Brasil;
3. utilização de protocolos unificados para investigação e acompanhamento de pacientes com APLV.

## *APÊNDICES*

---

**APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Pesquisa: Avaliação do perfil de citocinas nas crianças e nos adolescentes com alergia alimentar****Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – Hospital das Clínicas**

Senhores pais ou responsáveis,

A alergia alimentar é uma doença que ocorre quando o organismo desenvolve mecanismos de defesa contra alimentos que ele reconhece como estranhos. A partir daí, são produzidas substâncias para tentar proteger o organismo contra o alimento agressor. É possível que a identificação dessas substâncias auxilie no diagnóstico e no tratamento da doença. Essas informações estão sendo fornecidas para que você permita a participação voluntária de seu filho neste estudo, que quer avaliar a presença de tais substâncias na alergia alimentar.

Para a realização deste estudo, é necessária a realização de uma entrevista inicial para identificarmos os indivíduos com possível alergia alimentar. A seguir, serão realizados alguns exames que irão necessitar de uma colher de sopa de sangue; aplicação de alimentos na pele utilizando lancetas plásticas e descartáveis no braço, com resultado na mesma hora, e pequenos botões nas costas que deverão permanecer por 3 dias para se dar o resultado e observação de alguma reação durante a ingestão de alimentos que você possa achar que cause sintomas no seu filho. Todos esses exames serão realizados no Ambulatório de Alergologia Pediátrica e na Enfermaria de Pediatria do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. A criança deverá comparecer ao ambulatório nas consultas que serão marcadas com antecedência. Os exames na pele e a ingestão de alimentos podem causar coceira, vermelhidão e placas no corpo, diarréia, vômitos, falta de ar, se por acaso a criança tiver reação ao alimento. Por isso, eles serão realizados no hospital, para que haja o atendimento médico adequado imediato na ocorrência de reações graves. A ingestão de alimento suspeito de causar sintomas não será realizada nos indivíduos com risco para situações emergenciais (história de anafilaxia, edema de glote ou urticária recorrente) e será suspensa sempre que uma reação grave for aparente. Caso seja identificada alergia alimentar, seu filho será acompanhado no Ambulatório de Pediatria do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Em qualquer etapa do estudo, o paciente terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os investigadores poderão ser encontrados no Ambulatório de Alergologia e Gastroenterologia Pediátrica da Universidade Federal de Pernambuco, telefone 2126-3918. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, que analisou e aprovou a realização desta pesquisa, localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco ou pelo telefone 2126-8588.

É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento de seu filho na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com aquelas de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles. Os senhores terão o direito de serem mantidos atualizados sobre todos os resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores. Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à participação do seu filho. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo, o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas. Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados somente para esta pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Avaliação do perfil de citocinas nas crianças e nos adolescentes com alergia alimentar”**.

Eu discuti com o Dr \_\_\_\_\_ sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação de meu filho, \_\_\_\_\_, é isenta de despesas e que ele terá garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente com a participação do meu filho neste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que meu filho possa ter adquirido, ou no seu atendimento neste Serviço.

Assinatura do representante legal: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

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

Assinatura do médico que obteve o consentimento: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B - Questionário



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PESQUISA: Avaliação de citocinas de crianças com alergia à proteína do leite de vaca  
IDENTIFICAÇÃO

Nome:.....

Mãe:.....

Endereço:.....

.....

Referência:.....

Telefones:

1.Número

2.Data de nascimento dd/mm/aa

3.Data entrevista

4.sexo

0.fem

1.masc

4.

NPAC  
DATNASC  
DATAENT  
SEXO

## HISTÓRIA PRÉ-NATAL E PERINATAL

5.A sua criança nasceu de tempo?

0. Sim 1.Não 9. Sem informação

5.

IDADGEST

6.Qual o tipo de parto?

0. normal 1.cesáreo

6.

TIPARTO

7. Qual foi o peso de nascimento? (ver o cartão e anotar)

0. maior de 2.500g 1.menor de 2.500g

7.

PESNASC

## HISTÓRIA ALIMENTAR

8. Sua criança mamou no peito?

1. sim 2.não 9. sem informação

8.

ALEIMAT

9.Se SIM, quanto tempo no peito sem outro alimento junto?

1. menos 30 dias

2. entre 1 - 4meses

3.entre4-6meses

4. maior de 6 meses

9. sem informação

9.

MAMEXCLU

10.Nome do primeiro leite (Anotar nome do leite )

0. Fórmula infantil 1.Leite integral 9. sem informação

10.

LEITFORM

## VACINAS ( VER CARTÃO E ANOTAR N. DE DOSES )

11. Cartão de vacinas

0. completo 1.incompleto 9. sem informação

11.

VACINA

BCG  DPT  TRIPLICE VIRAL  HIB  PÓLIO

SARAMPO  HEPATITE

## HISTÓRIA FAMILIAR PARA DOENÇA ALÉRGICA

12. Alguém da família sofre de asma , cansaço, falta de ar ou chiado no peito?

12.

FAMASMA

0. não 1.pai 2 . mãe 3. pai e mãe 4. Irmão 9. sem informação

12.

13. Alguém na familia tem coceira no nariz ou espirros frequentes ou nariz escorrendo  
sem estar gripado ?

13.

FAMRINI

0. Não 1. pai 2. mãe 3. pai e mãe 9. sem informação

14. Alguém na família tem placas ou coceira na pele?

FAMDERM

0. não 1. pai 2. mãe 3. pai e mãe 4. irmão  
9. sem informação14. 

## HISTÓRIA ESPECÍFICA DE ALERGIA A LEITE DE VACA

CSINT

15. A sua criança apresenta algum sintoma após ingerir leite de vaca ou algum produto com leite de vaca?

0.não 1. Sim 9. sem informação

15 

## SINTOMAS

O que a sua criança apresenta que você relaciona quando toma leite

## SINTOMAS GASTRINTESTINAIS

16. Vômito

16. 

GI-1

0. Não 1. Sim 9. sem informação

17. Enjôo

17. 

GI-2

0. Não 1. Sim 9. sem informação

18. diarreia

18. 

GI-3

0.não 1. Sim 9. sem informação

19. Sangue no cocô

19. 

0. Não 1. Sim 9. sem informação

20. Catarro no cocô

20. 

0. sim 1. Sim 9. sem informação

21. Cocô volumoso

21. 

GI-6

0.não 1. Sim 9. sem informação

22. Esforço para evacuar

22. 

GI-7

0.não 1. Sim 9. sem informação

23. Dor na barriga

23. 

GI-8

0.não 1. Sim 9. sem informação

24. Barriga aumentada

24. 

GI-9

0. Não 1. Sim 9. sem informação

25. Intestino preso

25. 

GI-10

0. Não 1. sim 9. sem informação

26. Coloca sangue pelo reto

26. 

GI-11

0.Não 1. Sim 9. sem informação

27. Corte no ânus

27. 

GI-12

0. Não 1. Sim 9. sem informação

28. Cólica

28. 

GI-13

0.Não 1. Sim 9. sem informação

29. Distensão abdominal

29. 

GI-14

0.Não 1. Sim 9. sem informação

30. Ânus vermelho, inchado, ferido

30. 

GI-15

0.Não 1. Sim 9. sem informação

31. Outros:

GI-16

## SINTOMAS CUTÂNEOS

32. Placas na pele

0. Não      1. Sim      9. sem informação

CUT-1

33. Coceira na pele

0. Não      1. sim      9. sem informação

CUT-2

34. Inchaço nos olhos

0. Não      1. sim      9. sem informação

CUT-3

35. Inchaço na boca

0. Não      1. Sim      9. sem informação

CUT-4

36. Inchaço no corpo

0. Não      1. Sim      9. sem informação

37. Outros .....

CUT-6

## SINTOMAS GERAIS

38. Ganha pouco peso

0. Não      1. Sim      9. sem informação

GER-1

39. Não cresce

0. Não      1. Sim      9. sem informação

GER-2

40. Outros.....

GER-3

## SISTEMA -ALVO (O QUE OCORRE QUANDO SE EXPÕE AO LEITE DE VACA, SINTOMA(S) PARA O DESENCADEAMENTO SER CONSIDERADO POSITIVO)

GI.....

RESP.....

CUT.....

GERAL.....

## AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

41. Data nascimento:ddmm/ano

42. Peso .....g

43. Estatura.....cm

44. P/I.....

45. E/I.....

46. P/E.....

## EXAME FÍSICO

47. Eczema

0. Não      1. Sim

ECZEMA

48. Distensão abdominal

0. Não      1. Sim

DISTABD

49. Proctite

0. Não      1. Sim

PROCT

## 50.Palidez

0. Não      1. Sim

50.

PALID

## 51.Outros.....

## EXAMES COMPLEMENTARES

## 52.IgEtotal

0. normal      1. Elevada      nível.....UL/ml

52.

IgEtot

## 53. Caseína

0. normal      1. Elevada      nível.....KU/L

53.

CASEINA

## 54.α-lactoalbumina

0. normal      1. Elevada      nível.....KU/L

54.

α-LACT

## 55.β-lactoglobulina

0. normal      1. Alterada      nível.....KU/L

55.

β-LACT

## 56.Interleucina -4

concentração .....pg./ml..

56.

IL4

## 57. Interferon-γ 4

concentração .....pg./ml

57.

INF-Y

## 58.Prick-test

0. negativo

1. Positivo.....mm

58.

PRICK

## 59.Patch-test

0. negativo

1. positivo.....mm.

59.

PATCHT

## 60. Desencadeamento

0. Negativo      1. positivo

60.

DESENCAD

## EVOLUÇÃO 4 semanas após teste no hospital

Condutas

Primeira semana Queixa.....

Exame físico.....

Peso:

Segunda semana

Queixa.....  
Exame físico.....  
Peso:

Terceira semana  
Queixa.....  
Exame físico

Quarta semana  
Queixa.....  
Exame físico

Peso:  
Outras informações  
**Data:**

## ***ANEXOS***

---



**SERVÍCIO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
Comitê de Ética em Pesquisa**

Of. N.º 219/2006-CEP/CCS

Recife, 07 de novembro de 2006

Registro do SISNEP FR – 105761

CAAЕ – 0204.0.172.000-06

Registro CEP/CCS/UFPE N.º 197/06

Titulo: **"Avaliação do perfil de citocinas nas crianças e nos adolescentes com alergia alimentar"**

Pesquisador Responsável: Maria Eugênia Farias Almeida Motta

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para inicio da coleta de dados em 06 de novembro de 2006.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório anual da pesquisa.

Atenciosamente,

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto  
Coordenador do CEP/CCS / UFPE  
José Angelo Rizzo  
Vice - Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A  
Dr.º Maria Eugênia Farias Almeida Motta  
Hospital das Clínicas – HC / UFPE



## Normas de Publicação

- Janeiro de 2009 -

<http://www.jped.com.br/port/normas/normas.asp>

### Informações gerais

O Jornal de Pediatria é a publicação científica da Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP), com circulação regular desde 1904. Atualmente, sua versão impressa atinge quase 20.000 leitores e instituições no Brasil e na América Latina. Todo o conteúdo do Jornal de Pediatria está disponível em português e inglês no site <http://www.jped.com.br>, que é de livre acesso. O Jornal de Pediatria é indexado pelo Index Medicus/MEDLINE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Scielo (<http://www.scielo.org>), LILACS (<http://www.bireme.brasil.br/lilacs.htm>), EMBASE/Excerpta Medica (<http://www.embase.com>), Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIC) Data Bases (<http://www.sicsalud.com>), Medical Research Index (<http://www.purplehealth.com/medical-research-index.htm>) e University Microfilms International.

O Jornal de Pediatria publica resultados de investigação clínica em pediatria e, excepcionalmente, de investigação científica básica. O Jornal de Pediatria aceita a submissão de artigos em português e inglês. Na versão impressa da revista, os artigos são publicados exclusivamente em inglês. A grafia adotada é a do inglês americano. No site, todos os artigos são publicados em português e inglês, tanto em HTML quanto em PDF. Os sócios da SBP também recebem uma cópia impressa da revista em português.

### Processo de revisão (Peer review)

Todo o conteúdo publicado pelo Jornal de Pediatria passa por processo de revisão por especialistas (peer review). Cada artigo submetido para apreciação é encaminhado aos editores, que fazem uma revisão inicial quanto aos padrões mínimos de exigência do Jornal de Pediatria e ao atendimento de todas as normas requeridas para envio das originais. A seguir, remetem o artigo a dois revisores especialistas na área pertinente, selecionados de um cadastro de revisores. Os revisores são sempre de instituições diferentes da instituição de origem do artigo e não cegos quanto à identidade dos autores e local de origem do trabalho. Após receber ambos os pareceres, o Conselho Editorial os avalia e decide pela aceitação do artigo sem modificações, pela recusa ou pela devolução aos autores com as sugestões de modificações. Conforme a necessidade, um determinado artigo pode retornar várias vezes aos autores para esclarecimentos e, a qualquer momento, pode ter sua recusa determinada, mas cada versão é sempre analisada pelo Conselho Editorial, que detém o poder da decisão final.

### Tipos de artigos publicados

O Jornal de Pediatria aceita a submissão espontânea de artigos originais, comunicações breves, artigos especiais e cartas ao editor.

**Editoriais e comentários**, que geralmente referem-se a artigos selecionados, são encorajados a autoridades em áreas específicas. O Conselho Editorial também analisa propostas de comentários submetidos espontaneamente.

**Artigos originais** incluem estudos controlados e randomizados, estudos de testes diagnósticos e de triagem e outros estudos descritivos e de intervenção, bem como pesquisa básica com animais de laboratório. O texto deve ter no máximo 3.000 palavras, excluindo tabelas e referências; o número de referências não deve exceder 30. O número total de tabelas e figuras não pode ser maior do que quatro.

Artigos que relataram ensaios clínicos com intervenção terapêutica (clinical trials) devem ser registrados em um dos Registros de Ensaios Clínicos listados pela Organização Mundial da Saúde e pelo International Committee of Medical Journal Editors. Na ausência de um registro latino-americano, o Jornal de Pediatria sugere que os autores utilizem o registro [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), dos National Institutes of Health (NIH). O número de identificação deverá ser apresentado ao final do resumo.

**Comunicações breves** são artigos curtos, com um limite de 1.500 palavras, excluindo referências e tabelas, que descrevem observações experimentais que não justificam a publicação como artigo original. Excepcionalmente, serão considerados nessa categoria relatos de casos de pacientes ou situações singulares, doenças raras ou nunca descritas, assim como formas inovadoras de diagnóstico ou tratamento. Dependendo do tópico, o texto pode ser organizado como um artigo original (ver acima) ou seguir o formato de relato de caso, ou seja: iniciar por uma introdução breve que situa o leitor quanto à importância do assunto e apresenta os objetivos da apresentação dos(s) caso(s); por um relato resumido do caso; e por comentários que discutem aspectos relevantes e comparam o relato com outros casos descritos na literatura. O número

máximo de referências é 15. Não incluir mais de duas figuras ou tabelas. O resumo deve ser estruturado conforme o tipo de artigo (ver Diretrizes para a Preparação do Original).

**Cartas ao editor** devem comentar, discutir ou criticar artigos publicados no Jornal de Pediatria. O tamanho máximo é de 1.000 palavras, incluindo no máximo seis referências bibliográficas. Sempre que possível, uma resposta dos autores será publicada junto com a carta.

**Artigos de revisão** – avaliações críticas e ordenadas da literatura em relação a temas de importância clínica, com ênfase em tópicos como causas e prevenção de doenças, seu diagnóstico, tratamento e prognóstico – são em geral escritos, mediante convite, por profissionais de reconhecida experiência. Metanálises se incluem nesta categoria. Autores não convidados podem também submeter ao Conselho Editorial uma proposta de artigo de revisão, com um resumo. Se aprovado, o autor pode desenvolver o roteiro e submetê-lo para publicação. Artigos de revisão devem limitar-se a 6.000 palavras, excluindo referências e tabelas. As referências bibliográficas deverão ser atuais e em número mínimo de 30.

**Artigos especiais** são textos não classificáveis nas categorias acima, que o Conselho Editorial juge de especial relevância. Sua revisão admite critérios próprios, não havendo limite de tamanho ou exigências prévias quanto à bibliografia.

### Instruções para envio de material para publicação

Os manuscritos devem ser enviados preferencialmente através do site de submissão de artigos <http://www.jpededitorial.com.br>. O autor responsável pela correspondência deve efetuar seu cadastro antes de submeter seu artigo. Excepcionalmente, aceitaremos a submissão de artigos via e-mail.

### Instruções para envio de material por e-mail

1. **Enviar para:** [jped@jped.com.br](mailto:jped@jped.com.br)
2. **Assunto:** escrever o título abreviado do artigo.
3. **Corpo da mensagem:** deve conter o título do artigo e o nome do autor responsável pelos contatos pré-publicação, seguidos de uma declaração em que os autores asseguram que:
  - a) o artigo é original;
  - b) nunca foi publicado e, caso venha a ser aceito pelo Jornal de Pediatria, não será publicado em outra revista;
  - c) não foi enviado a outra revista e não o será enquanto sua publicação estiver sendo considerada pelo Jornal de Pediatria;
  - d) todos os autores participaram da concepção do trabalho, da análise e interpretação dos dados e de sua redação ou revisão crítica;
  - e) todos os autores leram e aprovaram a versão final;
  - f) não foram omitidas informações sobre quaisquer ligações ou acordos de financiamento entre os autores e companhias ou pessoas que possam ter interesse no material abordado no artigo;
  - g) todas as pessoas que fizeram contribuições substanciais para o artigo, mas não preencheram os critérios de autoria, são citados nos agradecimentos, para o que forneceram autorização por escrito;
  - h) reconhecem que a Sociedade Brasileira de Pediatria passa a ter os direitos autorais, caso o artigo venha a ser publicado. (Obs.: caso o artigo seja aceito para publicação, será solicitado o envio desta declaração com a assinatura de todos os autores.)
4. **Arquivos anexados:** anexar dois arquivos separados, contendo respectivamente: (a) página de rosto, resumo em português (ou inglês, se o artigo for submetido em inglês), palavras-chave, texto e referências bibliográficas; (b) tabelas e figuras. Esses arquivos devem permitir a leitura pelos programas do Microsoft Office® (Word, Excel e Access).

### Diretrizes para a Preparação do Original

#### Orientações gerais

O original – incluindo tabelas, ilustrações e referências bibliográficas – deve estar em conformidade com os “Requisitos Uniformes para Originais Submetidos a Revistas Biomédicas”, publicado pelo Comitê Internacional de Editores de

Revistas Médicas<sup>1,2</sup> (ver a última atualização, de fevereiro de 2006, disponível em [http://www.gped.com.br/port/normas/normas\\_07.asp](http://www.gped.com.br/port/normas/normas_07.asp)). Cada seção deve ser iniciada em nova página, na seguinte ordem: página de rosto, resumo em português, resumo em inglês, texto, agradecimentos, referências bibliográficas, tabelas (cada tabela completa, com título e notas de rodapé, em página separada), figuras (cada figura completa, com título e notas de rodapé em página separada) e legendas das figuras.

A seguir, as principais orientações sobre cada seção:

#### Página de rosto

A página de rosto deve conter todas as seguintes informações:

- a) título do artigo, conciso e informativo, evitando termos superfluos e abreviaturas; evitar também a indicação do local e da cidade onde o estudo foi realizado, exceto quando isso for essencial para a compreensão das conclusões;
- b) título abreviado (para constar na capa e topo das páginas), com máximo de 60 caracteres, contando os espaços;
- c) nome de cada um dos autores (o primeiro nome e o último sobrenome devem obrigatoriamente ser informados por extenso; todos os demais nomes aparecerem como inicial);
- d) titulação mais importante de cada autor;
- e) endereço eletrônico de cada autor;
- f) informar se cada um dos autores possui currículo cadastrado na plataforma Lattes do CNPq;
- g) a contribuição específica de cada autor para o estudo;
- h) declaração de conflito de interesses (escrever "nada a declarar" ou a menção clara de quaisquer interesses econômicos ou de outra natureza que poderiam causar constrangimento se conhecidos depois da publicação do artigo);
- i) definição de instituição ou serviço oficial ao qual o trabalho está vinculado para fins de registro no banco de dados do Index Medicus/MEDLINE;
- j) nome, endereço, telefone, fax e endereço eletrônico do autor responsável pela correspondência;
- k) nome, endereço, telefone, fax e endereço eletrônico do autor responsável pelos contatos pré-publicação;
- l) fonte financeira ou fornecedora de equipamento e materiais, quando for o caso;
- m) contagem total das palavras do texto, excluindo o resumo, agradecimentos, referências bibliográficas, tabelas e legendas das figuras;
- n) contagem total das palavras do resumo;
- o) número de tabelas e figuras.

#### Resumo

O resumo deve ter no máximo 250 palavras ou 1.400 caracteres, evitando o uso de abreviaturas. O resumo das comunicações breves deve ter no máximo 150 palavras. Todas as informações que aparecem no resumo devem aparecer também no artigo. O resumo deve ser estruturado<sup>3</sup>, conforme descrito a seguir:

#### Resumo de artigo original

**Objetivo:** informar por que o estudo foi iniciado e quais foram as hipóteses iniciais, se houve alguma. Definir precisamente qual foi o objetivo principal e informar sumariamente os objetivos secundários mais relevantes.

**Métodos:** informar sobre o delineamento do estudo (definir, se pertinente, se o estudo é randomizado, cego, prospectivo, etc.), o contexto ou local (definir, se pertinente), o nível de abrangência, se primário, secundário ou terciário, clínica privada, institucional, etc.), os pacientes ou participantes (definir critérios de seleção, número de casos no início e fim do estudo, etc.), as intervenções (descrever as características essenciais, incluindo métodos e duração) e os critérios de mensuração do desfecho.

**Resultados:** informar os principais dados, intervalos de confiança e significância estatística.

**Conclusões:** apresentar apenas aquelas apoiadas pelos dados do estudo e que contemplam os objetivos, bem como sua aplicação prática, dando ênfase igual a achados positivos e negativos que tenham méritos científicos similares.

#### Resumo de artigo de revisão

**Objetivo:** informar por que a revisão da literatura foi feita, indicando se ela enfatiza algum fator em especial, como causa, prevenção, diagnóstico, tratamento ou prognóstico.

**Fontes dos dados:** descrever as fontes da pesquisa, definindo as bases de dados e os anos pesquisados. Informar sucintamente os critérios de seleção de artigos e os métodos de extração e avaliação da qualidade das informações.

**Síntese dos dados:** informar os principais resultados da pesquisa, sejam quantitativos ou qualitativos.

**Conclusões:** apresentar as conclusões e suas aplicações clínicas, limitando generalizações aos domínios da revisão.

#### Resumo de comunicação breve

Para observações experimentais, utilizar o modelo descrito para resumo de artigo original.

Para **relatos de caso**, utilizar o seguinte formato:

**Objetivo:** informar por que o caso merece ser publicado, com ênfase nas questões de raridade, ineditismo ou novas formas de diagnóstico e tratamento.

**Descrição:** apresentar sinteticamente as informações básicas do caso, com ênfase nas mesmas questões de ineditismo e inovação.

**Comentários:** conclusões sobre a importância do relato para a comunidade médica e as perspectivas de aplicação prática das abordagens inovadoras.

Abaixo do resumo, fornecer de três a seis **descritores**, que são palavras-chave ou expressões-chave que auxiliam a inclusão adequada do resumo nos bancos de dados bibliográficos. Empregar descritores integrantes da lista de "Descritores em Ciências da Saúde"<sup>4</sup>, elaborada pela BIREME e disponível nas bibliotecas médicas ou na Internet (<http://decs.bvs.br>). Se não houver descritores adequados na referida lista, usar termos novos.

#### Abreviaturas

Devem ser evitadas, pois prejudicam a leitura confortável do texto. Quando usadas, devem ser definidas ao serem mencionadas pela primeira vez. Jamais devem aparecer no título e nos resumos.

#### Texto

O texto dos **artigos originais** deve conter as seguintes seções, cada uma com seu respectivo subtítulo:

a) **Introdução:** sucinta, citando apenas referências estreitamente pertinentes para mostrar a importância do tema e justificar o trabalho. Ao final da introdução, os objetivos do estudo devem ser claramente descritos.

b) **Métodos:** descrever a população estudada, a amostra e os critérios de seleção, definir claramente as variáveis e detalhar a análise estatística; incluir referências padronizadas sobre os métodos estatísticos e informação de eventuais programas de computação. Procedimentos, produtos e equipamentos utilizados devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir a reprodução do estudo. É obrigatória a inclusão da declaração de que todos os procedimentos tiveram sido aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da instituição a que se vinculam os autores ou, na falta deste, por um outro comitê de ética em pesquisa indicado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde<sup>5</sup>.

c) **Resultados:** devem ser apresentados de maneira clara, objetiva e em sequência lógica. As informações comitidas em tabelas ou figuras não devem ser repetidas no texto. Usar gráficos em vez de tabelas com um número muito grande de dados.

d) **Discussão:** deve interpretar os resultados e compará-los com os dados já descritos na literatura, enfatizando os aspectos novos e importantes do estudo. Discutir as implicações dos achados e suas limitações, bem como a necessidade de pesquisas adicionais. As conclusões devem ser apresentadas no final da discussão, levando em consideração os objetivos do trabalho. Relacionar as conclusões aos objetivos iniciais do estudo, evitando assertivas não apoiadas pelos achados e dando ênfase igual a achados positivos e negativos que tenham méritos científicos similares. Incluir recomendações, quando pertinentes.

O texto de **artigos de revisão** não obedece a um esquema rígido de seções. Sugere-se uma introdução breve, em que os autores explicam qual a importância da revisão para a prática pediátrica, à luz da literatura médica. Não é necessário descrever os métodos de seleção e extração dos dados, passando logo para a sua síntese, que, entretanto, deve apresentar todas as informações pertinentes em detalhe. A seção de conclusões deve correlacionar as ideias principais da revisão com as possíveis aplicações clínicas, limitando generalizações aos domínios da revisão.

O texto de **relatos de caso** deve conter as seguintes seções, cada uma com seu respectivo subtítulo:

a) **Introdução:** apresentar de modo sucinto o que se sabe a respeito da doença em questão e quais são as políticas de abordagem diagnóstica e terapêutica, por meio de uma breve, porém atual, revisão da literatura.

b) **Descrição do(s) caso(s):** o caso é apresentado com detalhes suficientes para o leitor compreender toda a evolução e seus fatores condicionantes. Quando o artigo tratar do relato de mais de um caso, sugere-se agrupar as informações em uma tabela, por uma questão de clareza e aproveitamento do espaço. Evitar incluir mais de duas figuras.

c) **Discussão:** apresentar correlações do(s) caso(s) com outros descritos e a importância do relato para a comunidade pediátrica, bem como as perspectivas de aplicação prática das abordagens inovadoras.

## Agradecimentos

Devem ser breves e objetivos, acionante a pessoas ou instituições que contribuam significativamente para o estudo, mas que não tenham preenchido os critérios de autoria. Integrantes da lista de agradecimento devem dar sua autorização por escrito para a divulgação de seus nomes, uma vez que os leitores podem supor seu endosso às conclusões do estudo.

## Referências bibliográficas

As referências bibliográficas devem ser numeradas e ordenadas segundo a ordem de aparecimento no texto, no qual devem ser identificadas pelos algoritmos analíticos respectivos sobreescritos. Para listar as referências, não utilize o recurso de notas de fim ou notas de rodapé do Word. As referências devem ser formatadas no estilo Vancouver, de acordo com os exemplos listados a seguir:

### 1. Artigo padrão

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2002;347:284-7.

Se houver mais de 6 autores, cite os seis primeiros nomes seguidos de "et al".

### 2. Livro

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

### 3. Capítulo de livro

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editores. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

### 4. Teses e dissertações

Borkowski MM. *Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans* [dissertação]. Mount Pleasant (MI): Central Michigan University; 2002.

### 5. Trabalho apresentado em congresso ou similar (publicado)

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editores. *Genetic programming: EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming*. 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Inglaterra: Springer; 2002. p. 182-91.

### 6. Artigo de revista eletrônica

Zimmerman RK, Wolfe RM, Fox DE, Fox JR, Nowak MP, Troy JA et al. Vaccine criticism on the World Wide Web. *J Med Internet Res*. 2005;7(2):e17. <http://www.jmir.org/2005/2/e17>. Acesso: 17/12/2005.

### 7. Materiais da Internet

#### 7.1 Artigo publicado na Internet

Wantland DJ, Portillo CJ, Holzemer WL, Staugler R, McGhee EM. The effectiveness of web-based vs. non-web-based interventions: a meta-analysis of behavioral change outcomes. *J Med Internet Res*. 2004;6(4):e40. <http://www.jmir.org/2004/4/e40>. Acesso: 29/11/2004.

#### 7.2 Site

Cancer-Pain.org [site na Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01. <http://www.cancer-pain.org/>. Acesso: 9/07/2002.

#### 7.3 Banco de dados na Internet

Who's certified [banco de dados na Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists; c2000. <http://www.abms.org/newssearch.asp>. Acesso: 8/03/2001.

**Obs.:** uma lista completa de exemplos de citações bibliográficas pode ser encontrada na Internet, em <http://www.icmje.org/> ou [http://www.jped.com.br/portinhornormas\\_07.asp](http://www.jped.com.br/portinhornormas_07.asp). Artigos aceitos para publicação, mas ainda não publicados, podem ser citados desde que indicando a revista e que estilo "no prelo". Observações não publicadas e comunicações pessoais não podem ser citadas como referências; se for imprescindível a inclusão de informações dessa natureza no artigo, elas devem ser seguidas pela observação: "observação não publicada" ou "comunicação pessoal" entre parênteses no corpo do artigo. Os títulos dos periódicos devem ser abreviados conforme recomenda o Index Medicus; uma lista com suas respectivas abreviaturas pode ser obtida através da publicação da NLM "List of Serials Indexed for Online Users", disponível no endereço <http://www.nlm.nih.gov/tds/serials/lsiou.html>. Para informações mais detalhadas, consulte os "Requisitos Uniformes para Originais Submetidos a Revistas Biomedicas". Este documento está disponível em <http://www.icmje.org/> ou [http://www.jped.com.br/portinhornormas\\_07.asp](http://www.jped.com.br/portinhornormas_07.asp).

## Tabelas

Cada tabela deve ser apresentada em folha separada, numerada na ordem de aparecimento no texto, e conter um título sucinto, porém explicativo. Todas as explicações devem ser apresentadas em notas de rodapé e não no título.

identificadas pelos seguintes símbolos, nesta sequência: ", †, ‡, §, ||, ¶, ††, ‡‡. Não sublinhar ou desenhar linhas dentro das tabelas, não usar espaços para separar colunas. Não usar espaço em qualquer lado do símbolo ±.

## Figuras (fotografias, desenhos, gráficos)

Todas as figuras devem ser numeradas na ordem de aparecimento no texto. Todas as explicações devem ser apresentadas nas legendas, inclusive acerca das abreviaturas utilizadas na tabela. Figuras reproduzidas de outras fontes já publicadas devem indicar essa condição na legenda, assim como devem ser acompanhadas por uma carta de permissão do detentor dos direitos. Fotos não devem permitir a identificação do paciente; tarjas cobrindo os olhos podem não constituir proteção adequada. Caso exista a possibilidade de identificação, é obrigatório a inclusão de documento escrito fornecendo consentimento livre e esclarecido para a publicação. Microfotografias devem apresentar escala interna e setas que contrastem com o fundo.

As ilustrações são aceitas em cores para publicação no site. Contudo, todas as figuras serão vertidas para o preto-e-branco na versão impressa. Caso os autores julguem essencial que uma determinada imagem seja colorida mesmo na versão impressa, solicita-se um contato especial com os editores. Imagens geradas em computador, como gráficos, devem ser anexadas sob a forma de arquivos nos formatos .jpg, .gif ou .tif, com resolução mínima de 300 dpi, para possibilitar uma impressão nítida; na versão eletrônica, a resolução será ajustada para 72 dpi. Gráficos devem ser apresentados sómente em duas dimensões, em qualquer circunstância. Desenhos, fotografias ou quaisquer ilustrações que tenham sido digitalizadas por escaneamento podem não apresentar grau de resolução adequado para a versão impressa da revista; assim, é preferível que sejam enviadas em versão impressa original (qualidade profissional, a nancim ou impressora com resolução gráfica superior a 900 dpi). Nesses casos, no verso de cada figura deve ser colada uma etiqueta com o seu número, o nome do primeiro autor e uma seta indicando o lado para cima.

## Legendas das figuras

Devem ser apresentadas em página própria, devitadamente identificadas com os respectivos números.

## Referências

1. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Updated February 2006. <http://www.icmje.org/>. Acesso: 28/03/2006.
2. Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas. Atualização de fevereiro de 2005. [http://www.jped.com.br/portinhornormas\\_07.asp](http://www.jped.com.br/portinhornormas_07.asp). Acesso: 28/03/2006.
3. Haynes RB, Mulrow CD, Huth EJ, Altman DJ, Gardner MJ. More informative abstracts revisited. *Ann Intern Med*. 1990;113:69-76.
4. BIREME - Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. DeCS - Descrições em ciências da saúde. <http://decs.bvs.br>. Acesso: 28/03/2006.
5. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução no. 196 de 10/10/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. DOU 1996 Out 16, no. 201, seção 1:21082-21085.

## Lista de verificação

Recomenda-se que os autores utilizem a lista abaixo para certificarem-se de que todo o material requerido está sendo enviado. Não é necessário anexar a lista.

- Declaração de que todos os autores viram e aprovaram a versão submetida, no corpo da mensagem do e-mail.
- Página de rosto com todas as informações solicitadas (integrante do primeiro arquivo anexado).
- Resumo na língua de submissão, com descrições (integrante do primeiro arquivo anexado).
- Texto contendo introdução, métodos, resultados e discussão (integrante do primeiro arquivo anexado).
- Texto contendo a informação sobre aprovação do trabalho por comitê de ética (no corpo do texto, na seção de M étodos).
- Referências bibliográficas no estilo Vancouver, numeradas por ordem de aparecimento (integrante do primeiro arquivo anexado).
- Tabelas numeradas por ordem de aparecimento.
- Figuras numeradas por ordem de aparecimento.
- Legendas das figuras.



Porto Alegre, 20 de Abril de 2010

**ARTIGO: Teste de desencadeamento alimentar oral na confirmação diagnóstica da alergia à proteína do leite de vaca**

**NÚMERO: 10 / 1044**

Prezada Dra. Maria das Graças Moura Lins,

É com satisfação que informamos que seu artigo foi aceito para publicação no Jornal de Pediatria.

Caso ainda não o tenha feito, solicitamos o envio, via correio, da carta de submissão assinada por todos os autores, conforme nossas normas de publicação, para o seguinte endereço:

Jornal de Pediatria  
Av. Carlos Gomes, 328 / 305  
CEP 90.480-000  
Porto Alegre / RS

O Jornal de Pediatria agradece a sua colaboração.

Atenciosamente,

Adriana Armani  
Assessoria Editorial  
Jornal de Pediatria  
[assessoria@jped.com.br](mailto:assessoria@jped.com.br)