

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**POTENCIAL ALERGÊNICO DA CARNE DE RÃ SUBMETIDA A  
PDIFERENTES PROCESSAMENTOS**

Tatiana Coura Oliveira  
*Magister Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

**TATIANA COURA OLIVEIRA**

**POTENCIAL ALERGÊNICO DA CARNE DE RÃ SUBMETIDA A  
DIFERENTES PROCESSAMENTOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência da Nutrição, para  
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

**TATIANA COURA OLIVEIRA**

**POTENCIAL ALERGÊNICO DA CARNE DE RÃ SUBMETIDA A  
DIFERENTES PROCESSAMENTOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência da Nutrição, para  
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de maio de 2007.

---

Prof<sup>ª</sup>. Neuza Maria Brunoro Costa  
(Co-orientador)

---

Prof. José Mario da Silveira Mezêncio  
(Co-orientador)

---

Prof<sup>ª</sup>. Maria do Carmo Gouveia Pelúzio

---

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta

---

Prof<sup>ª</sup>. Josefina Bressan  
(Orientador)

A meus pais José Cândido e Maria da Conceição.

A meus irmãos Adriana e Maxwell.

Ao querido Harvey.

Senhor tu me sondas e me conheces.  
Sabes quando me assento e me levanto; de longes penetras os meus pensamentos.  
Esquadrinhas o meu andar e o meu deitar, e conheces todos os meus caminhos.  
Ainda a palavra não me chegou à boca, e tu, Senhor, já a conheces.  
Tu me cercas por trás e por diante e sobre mim põe a Tua mão.  
Para onde me ausentarei do teu espírito? Para onde fugirei da tua face?  
Se subir aos céus lá estarás, se faço a minha cama no mais profundo abismo, lá estás  
também; se tomar as assas da alvorada e me deter nos confins dos mares: ainda lá me  
haverá de guiar a tua mão e a tua destra me susterá.  
Os teus olhos me viram ainda substância informe, e no teu livro foram escritos todos os  
meus dias – cada um deles escrito e determinado.  
Sonda-me o Deus e conhece o meu coração, prova-me e conhece os meus pensamentos.  
Vê se há em mim algum caminho mau e guia-me pelo caminho eterno.

Salmo 139: 1-24.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela misericórdia e graça com que tem guiado meus passos e me consolado nos momentos de angústia.

Aos meus pais pelo carinho e palavras de conforto e incentivo – amo vocês!

Ao Harvey, pelo apoio e compreensão nos momentos em que me fiz ausente.

Aos professores Josefina, Mezêncio e Neuza pela oportunidade de amadurecimento pessoal e intelectual.

Às professoras Carminha e Céphora, pessoas maravilhosas que passaram pela minha vida.

Aos velhos e novos amigos conquistados durante esta caminhada: obrigada por compartilharem comigo o tempo e a sabedoria de vocês. Em especial a Nilma, Angélica, Vanessa, Cassiano, Fabrícia, Marcelo, Marcos, Luis Márcio, Vinícius, Christiano, Ritinha, Kellen, Solange, Ana Laura, Nilcemar e Terezinha.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, meu sincero agradecimento. Às minhas queridas estagiárias Clarisse, Giu e Fernanda, o trabalho de vocês foi extremamente importante. Ao Sr. Adão e Juliano que me receberam de braços abertos no Biotério.

Agradeço à UFV pela oportunidade de aprimoramento do meu conhecimento.

Agradeço em especial ao Sérgio, mais que um professor, um amigo especial que recebeu de forma tão carinhosa e me proporcionou por meio de sua generosidade a aquisição de conhecimentos que levarei para o resto da vida.

## **BIOGRAFIA**

Tatiana Coura Oliveira, filha de José Cândido de Oliveira e Maria da Conceição Coura Oliveira, nasceu em 19 de junho de 1978 na cidade de Ipatinga – Minas Gerais.

Em agosto de 1996 iniciou o Curso de Nutrição na Universidade Federal de Ouro Preto, concluindo-o em dezembro de 2000. De fevereiro de 2001 a janeiro de 2003 trabalhou com administração em serviços de alimentação coletiva.

Em novembro de 2002 iniciou o curso de especialização Gestão: alimentos e alimentação coletiva, concluindo-o em dezembro de 2003.

Em fevereiro de 2005 iniciou o mestrado em Ciência da Nutrição, no Departamento de Nutrição e Saúde concluindo-o em maio de 2007.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1: ALERGIA ALIMENTAR: DO DIAGNÓSTICO AO TRATAMENTO NUTRICIONAL.....	5
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUÇÃO.....	7
DIAGNÓSTICO DA ALERGIA ALIMENTAR.....	9
PRINCIPAIS.....	12
ALÉRGENOS.....	
PERSPECTIVAS PARA O CONTROLE DAS ALERGIAS.....	15
CONCLUSÃO.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
CAPÍTULO 2: DIGESTIBILIDADE DA CARNE DE RÃ, BOI E DO LEITE SUBMETIDOS A DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS.....	24
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	28
DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> .....	29
ÉLETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	29
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	37
BIBLIOGRÁFICAS.....	
CAPÍTULO 3: ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO INTESTINO DELGADO DE CAMUNDONGOS BALB/C EM MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DA ALERGIA ALIMENTAR.....	43
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44



INTRODUÇÃO.....	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	46
ANIMAIS.....	46
PREPARO DAS DIETAS.....	47
PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO.....	48
PREPARO DO EXTRATO PARA SENSIBILIZAÇÃO E GAVAGEM.....	49
COLETA DO MATERIAL.....	49
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
APÊNDICE 1.....	69
APÊNDICE 2.....	72
CONCLUSÃO GERAL.....	75

## RESUMO

OLIVEIRA, Tatiana Coura, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2007.

**Potencial alergênico da carne de rã submetida a diferentes processamentos.**

Orientador: Josefina Bressan. Co-orientadores: Neuza Maria Brunoro Costa, José Mário da Silveira Mezêncio e Samuel Lopes Lima.

Os trabalhos experimentais descritos nesta dissertação objetivaram avaliar o impacto do processamento térmico sobre a alergenicidade da carne de rã. Para tal, realizaram-se dois ensaios experimentais. No primeiro analisou-se, por meio de análises de digestibilidade *in vitro* e eletroforese em gel de poliacrilamida, o comportamento do leite, da carne de rã e da carne de boi quando submetidos a diferentes tratamentos térmicos. Observou-se que tanto a pasteurização quanto a cocção a 95°C durante 15 minutos e a liofilização ocasionaram modificações nas estruturas constituintes do alimento. As proteínas mais sensíveis ao tratamento térmico, em ordem crescente, foram a carne de boi, a carne de rã e o leite de vaca. No segundo, objetivou-se verificar o impacto destas mesmas fontes protéicas, tratadas termicamente ou não, na morfometria do intestino delgado de camundongos BALB/C previamente sensibilizados. Este experimento teve duração de 28 dias e os animais foram sensibilizados por meio de injeção subcutânea no 1º e no 14º dia do experimento, com 1 mg de Al(OH)<sub>3</sub> e 1 mg das 3 fontes protéicas diferentes: extrato de leite *in natura*, extrato de carne de boi ou extrato de carne de rã. Os animais foram divididos em dois grupos, e cada grupo em quatro subgrupos sendo o primeiro grupo formado por um controle (CD), com animais não sensibilizados que receberam dieta semi-purificada padrão para roedores (AIN-93G) e três subgrupos denominados “controles positivos”, com animais sensibilizados com proteínas do leite (LTT), carne de rã (RTT) e bovina (BTT) *in natura*, que receberam

dietas AIN-93 modificadas em sua composição protéica de acordo com a sensibilização. O segundo grupo era formado por um subgrupocontrole (CG), com animais não sensibilizados que receberam dieta AIN-93 G e gavagem com água destilada e três outros subgrupos denominados “controles positivos”, formados por animais sensibilizados com extrato de leite (GGL), de carne de rã (GGR) e bovina (GGB) *in natura*, que receberam dieta AIN-93 e gavagem do alérgeno. O modelo experimental que recebeu o alérgeno *in natura* via gavagem apresentou alterações morfométricas mais evidentes quando comparado àquele que utilizou o alérgeno tratado termicamente na dieta. Evidenciou-se também a existência de algumas proteínas mais resistentes que outras no que refere à desnaturação, uma vez que quando comparados os resultados nos dois modelos, as diferenças foram mais proeminentes para os alérgenos leite e carne de rã, quando administrados *in natura*.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Tatiana Coura, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2007.

**Alergenic potential of the frog meat submitted the differents processing.**

Adviser: Josefina Bressan. Co-advisers: Neuza Maria Brunoro Costa, José Mário da Silveira Mezêncio and Samuel Lopes Lima.

The described experimental tasks in this essay intend to evaluate the impact of the thermal processing on the allergenicity of frog meat. Though, two experimental assays were taken. The first one, carried out by *in vitro* digestibility and sodium dodecyl polyacrylamide gel eletrophoresis (SDS-PAGE) analyses, analyzed the behavior of milk, frog and bovine meat when submitted the different thermal treatments. It was noticed that even the pasteurization, even the cooking at 95°C for 15 minutes, and the freeze-drying caused modifications in the constituent structures of the food. The most sensible proteins to the thermal treatment were bovine meat, frog meat and bovine milk. In the second one, the intention was to verify the impact of these same thermally or not treated protein sources, in the morfometry of the small intestine of BALB/c mice previously sensitized. This experiment last for 28 days and the animals were sensitized by means of subcutaneous injection in the 1<sup>st</sup> and 14<sup>th</sup> days of the experiment with 1 mg of Al(OH)<sub>3</sub> and 1 mg of the one of three different protein sources: milk extract, raw bovine meat extract or frog meat extract. The animals were split in two groups, the first one composed by four sub-groups: controlled (CD), with animals not sensitized that had received standard semi purified diet for rodents (AIN-93G), and three groups called "positive controls", with sensitized animals by milk proteins (LTT), raw frog meat (RTT) and bovine (BTT), that received AIN-93 modified diets in its protein composition according to the sensitization. The second was also composed by four sub-

groups: one called controlled (CG), with not sensitized animals that had received AIN-93 G diet and gavage with distilled water, and three other called "positive controls" groups with sensitized animals with milk extract (GGL), frog meat (GGR) and raw bovine meat (GGB), that received AIN-93 diet and gavage from the allergen. The experimental model that received the crude allergen by gavage presented more evident morphometric alteration when compared with the one that used the thermally treated allergen in the diet. The existence of some more resistant proteins than others was also proven related to the denaturation, once compared the results in the two models, the differences were more prominent for the milk and frog meat allergens than when managed crude.

## INTRODUÇÃO GERAL

A *Rana catesbeiana* foi introduzida no Brasil em 1935, por meio da importação de exemplares vindos dos Estados Unidos. Seu cultivo despertou grande interesse econômico, graças à prolificidade, precocidade de crescimento, resistência a enfermidades e ao sabor da carne. Nesse cenário, a ranicultura vem se solidificando em âmbito nacional, pois a *Rana catesbeiana* demonstra ótima capacidade de adaptação aos diferentes regimes climáticos, bem como aos diferentes manejos físicos e alimentares típicos de cada região.<sup>1</sup>

Suas principais formas de comercialização são “rãs inteiras”, resfriadas ou congeladas e “coxa congelada” a qual apresenta maior aceitação por parte do consumidor. O dorso apresenta baixo valor comercial, sendo destinado então à obtenção de carne mecanicamente separada (CMS), que por sua vez pode ser usada como matéria-prima para a fabricação de produtos como *nuggets*, patê e salsicha.<sup>2</sup>

Possui composição protéica semelhante a outras carnes ranças magras (16 a 19%), digestibilidade elevada e supera o padrão FAO/OMS (1985)<sup>3</sup> estabelecido para crianças e adultos em todos os aminoácidos essenciais, sendo contudo, ligeiramente deficiente em aminoácidos sulfurados como a leucina e a valina.<sup>4,5</sup> Também apresenta baixo teor de lipídeos (0,6 a 0,7%) especialmente de colesterol (cerca de 40 mg/100 g) quando comparada a outras carnes, tais como de boi (120 a 200 mg/100g), porco (100 a 300 mg/100g) e frango (100 a 150 mg/100 g). Contribui também com cálcio (16 a 20 mg/100 g), ferro (1 mg/ 100 g) e niacina (2,7 mg/100 g).<sup>6</sup>

Mesmo assim, existem poucos estudos sobre o valor nutricional da carne de rã e sobre suas aplicações dietéticas na prevenção ou mesmo no tratamento de patologias específicas.

Fidelis (2004)<sup>7</sup> avaliou a qualidade protéica da carne de rã em três apresentações; carne de rã sem osso (RSO), carne de rã com osso (RCO) e carne mecanicamente separada (CMS) cruas e desidratadas ou desidratadas e cozidas pelos métodos de coeficiente de eficiência protéica (PER), razão protéica líquida (NPR) e digestibilidade verdadeira. Dentre os resultados encontrados os valores para PER e NPR mostraram-se superiores ( $p < 0,05$ ) ao padrão caseína. Todas as apresentações apresentaram digestibilidade superior a 90%, demonstrando elevado valor nutricional.

Neste mesmo estudo foram ainda realizados ensaios biológicos com ratos Wistar para avaliação da biodisponibilidade de ferro e cálcio, encontrou-se que a RSO apresenta ferro biodisponível e equivalente ao padrão de sulfato ferroso (24 ppm), já RCO e CMS, não obtiveram resultados significantes ( $p > 0,05$ ), sendo este resultado atribuído ao elevado teor de cálcio observado nas mesmas. As carnes RSO e CMS não diferiram da dieta padrão de carbonato de cálcio para os parâmetros de peso e comprimento de fêmur e no coeficiente de eficiência alimentar dos animais, e se mostraram superiores ( $p < 0,05$ ) com relação ao teor de cálcio no fêmur. A carne de rã, portanto independentemente da forma, apresentou boa disponibilidade de cálcio, com absorção equivalente as encontradas para o leite e seus derivados.<sup>7</sup>

Cruz (2004)<sup>8</sup> avaliou os efeitos da carne de *Rana catesbeiana* em modelos animais diabéticos e dislipidêmicos. A carne de rã reduziu o colesterol dos animais não diabéticos e aumentou a glicemia dos diabéticos, sendo que proteínas séricas totais, albumina, triacilgliceróis, LDL e HDL colesterol foram semelhantes em ambos os grupos. O segundo ensaio foi realizado com camundongos nocaute para Apo E, tratados com dieta normolipídica com caseína, normolipídica com carne de rã, hiperlipídica com caseína e hiperlipídica com carne de rã. Não foram encontrados efeitos da carne de rã nas concentrações de LDL-colesterol, triacilgliceróis, glicose, como também nos lipídios hepáticos, tanto nas dietas normolipídicas quanto nas hiperlipídicas.

Lima *et al.*<sup>1</sup> evidenciaram que 16,3% dos consumidores efetivos da carne de rã, o fazem por problemas de saúde, alguns até sob receita médica. Alguns autores têm descrito a aplicação da carne de rã com finalidade terapêutica, principalmente no tratamento de alergias alimentares em crianças.<sup>9, 10</sup> Tradicionalmente utiliza-se em casos de alergia ao leite, fórmulas infantis feitas a partir de soja ou de hidrolisados do leite. Entretanto, mesmo estas podem causar sensibilidade alérgica em lactentes e sua indicação tem sido controversa.<sup>11, 12</sup> Além disso, tais fórmulas apresentam baixa palatabilidade e preços elevados.<sup>13</sup>

Como o diagnóstico de alergia alimentar implica, obrigatoriamente na necessidade de implementação de dieta de exclusão. Essa medida acarreta um elevado custo à família, com risco de prejuízo no ganho pômbero-estatural principalmente na infância. Evidencia-se assim a necessidade de se testar o potencial alergênico de outras

fontes protéicas, principalmente daquelas ricas em cálcio, que possam ser utilizadas com segurança nos casos de alergia ao leite de vaca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lima SL, Cruz TA, Moura MO. Ranicultura: Análise da Cadeia Produtiva. Viçosa: Folha de Viçosa, 1999. p 170.
2. Conceição C, Furtado AAL, Silva AT, Deliza R. Patê de carne de rã (*Rana catesbeiana*) formulação e aceitabilidade. Anais (vol. 3) XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de alimentos, Fortaleza CE, p 11-75, 2000.
3. FAO/WHO. Energy and proteins requirements report of a joint FAO/WHO Expert Consultation WHO Technical Report n 724. Genebra: WHO, 1985.
4. Peluzio MCG, Forato ALSC, Coelho AZM, Sant'ana HMP, Sabarense CM, Queiroz UMV, Azeredo RMC, Castro FAF. Composição centesimal e avaliação nutricional da carne de rã. Tecnofrog 95 – 8º Encontro Nacional de Ranicultura. Vol. 1, Viçosa MG, p 127, 1995.
5. ENDEF – Estudo Nacional de Despesa Familiar. Tabela de Composição de Alimentos. Rio de Janeiro, v 3, p 202, 1977.
6. Franco G. Tabela de Composição Química dos Alimentos. 8 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1992.
7. Fidelis IMG. Qualidade protéica e biodisponibilidade de ferro e cálcio em carne de rã touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802) [dissertação de mestrado]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004.
8. Cruz NR. Efeitos da carne de rã touro (*Rana catesbeiana*) em animais diabéticos e hipercolesterolêmicos [dissertação de mestrado]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004.



9. Guedes W, Lopes M, Manos S, Costa PS, Santos IF, Pardi HS, Guerreiro L. Estudo comparativo da insensibilização por CO<sub>2</sub> em rã (R. Catesbeiana). Anais (vol. 2) XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Fortaleza – CE, p 5.58, 2000.
10. Martins ER. Alergia Alimentar. *In*: RIOS, J. B. M.; Carvalho, L. P. Alergia Clínica – Diagnóstico e Tratamento. São Paulo: Revinter; 1995 p. 405-423.
11. Businco L, Cantani A, Longhi MA, Giampietro PG. Anaphylactic reactions to a cow's milk whey protein hydrolysate (Alfa-Re, Nestle) in infants with cow milk allergy. *Ann. Allergy*. 1989; 62: 333-335.
12. Docena G, Rozenfeld P, Fernández R, Fossat CA. Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests. *Allergy* 2002; 57: 83-91.
13. Bernhisel-Broadbent J, Yang E, Scanlon SM. Safety of casein hydrolysate formula in children with cow milk allergy. *J. Pediatr*. 1991; 118: 520-525.

**CAPÍTULO 1**  
**ALERGIA ALIMENTAR: DO DIAGNÓSTICO AO TRATAMENTO**  
**NUTRICIONAL**

**RESUMO**

Reações alérgicas induzidas por alimentos são responsáveis por uma variedade de sintomas envolvendo trato gastrointestinal, respiratório e pele e podem ser causadas por mecanismos mediados ou não por anticorpos do tipo IgE. Qualquer alimento pode provocar uma reação alérgica, mas efetivamente, poucos são realmente responsáveis pela maioria das reações, dentre eles cita-se o leite de vaca, ovos, pescado, crustáceos, amendoim e soja. Vários estudos apontam para a remissão da alergia ao leite e à soja após os três anos de idade, mas em contrapartida as alergias ao trigo, amendoim e pescado tendem a persistir ao longo dos anos. O artigo tem como objetivo apresentar uma revisão sobre alergias alimentares, com foco principal no desafio do diagnóstico e cuidado nutricional, detalhando as perspectivas de prevenção primária e de tratamento com as terapias imunomodulatórias e com probióticos.

**Palavras-chave:** alergia alimentar, alérgeno, diagnóstico, terapias imunomodulatórias

## **ABSTRACT**

Food induced allergic reactions are responsible for a variety of symptoms involving bowel, breathing and skin tract and they can be caused by IgE antibodies mediated or not mechanisms. Any food can provoke allergic reaction, but effectively, few are really responsible for the majority of the reactions, amongst them cow milk, eggs, fish, crustaceans, peanut and soy. Several studies point out to the remission of the allergy to milk and soy after the age of three, but on the other hand the allergies to wheat, fish and peanut tend to last through the years. The article has as objective to present a revision on food allergies, with main focus in the challenge of diagnosis and nutritional care, detailing the primary prevention and treatment perspectives with immunomodulators and probiotic therapies.

**Keywords:** food allergy, allergens, diagnostic, immunomodulatory therapies.

## INTRODUÇÃO

A alergia é uma reação imunológica, definida como um estado em que sintomas ou sinais reprodutíveis são iniciados após exposição a um alérgeno, em doses usualmente toleradas por qualquer indivíduo. <sup>1</sup>

As reações alérgicas de origem alimentar são algumas vezes confundidas com reações adversas aos alimentos, seja pela presença de contaminantes microbiológicos, tóxicos ou mesmo de fármacos nos alimentos. Recentemente, a Academia Européia de Alergologia e Imunologia Clínica (EAACI) sugeriu a utilização do termo “hipersensibilidade alimentar” como substituto do termo “intolerância alimentar”, para descrever toda e qualquer reação anormal, mediada ou não por imunoglobulina do tipo E (IgE) ou mesmo por anormalidades metabólicas. <sup>2</sup> A Figura 1 mostra um resumo das diferenças entre as reações adversas aos alimentos e as reações de hipersensibilidade de origem alimentar.

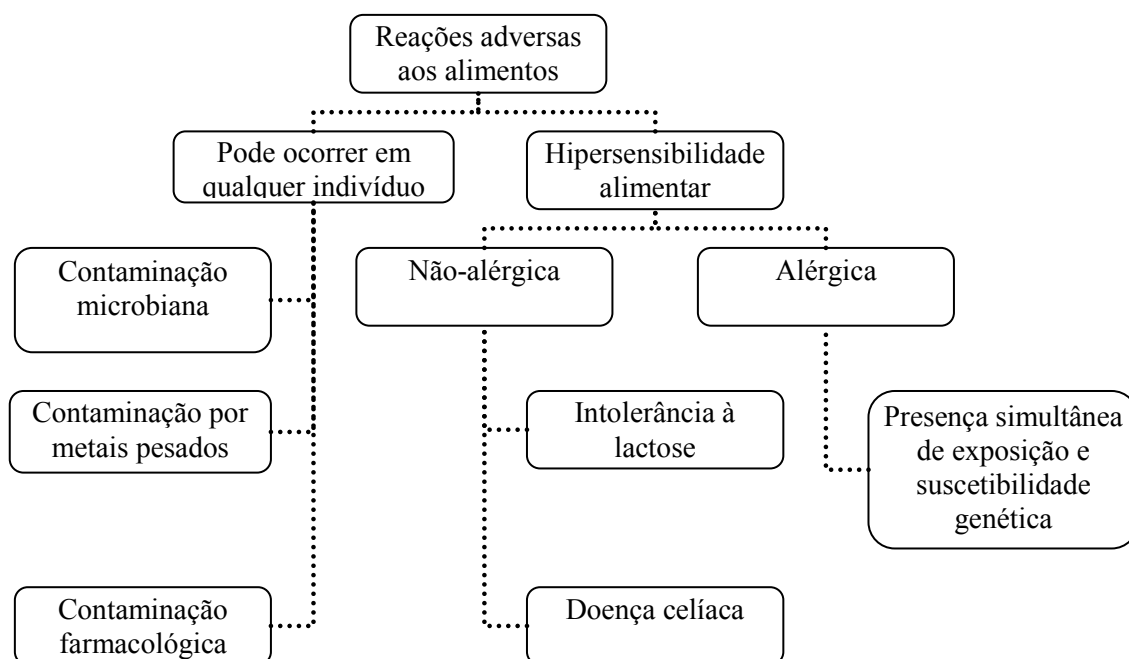


Figura 1 – Resumo das principais reações adversas aos alimentos.

Estudos sugerem que cerca de 2% da população adulta no mundo apresente hipersensibilidade alimentar, sendo 1% alergia alimentar propriamente dita. Os números são maiores para crianças com menos de três anos de idade, variando entre 6% e 8%. <sup>1,2,3</sup>

A prevalência da alergia alimentar varia de acordo com o hábito alimentar da população. Observa-se em culturas orientais, principalmente no Japão, maior

predominância de indivíduos alérgicos à soja; enquanto na França, existe uma maior frequência da alergia a ovos.<sup>3, 4</sup> Existem poucos trabalhos sobre a incidência das alergias alimentares em países em desenvolvimento. Sabrá *et al.*<sup>5</sup> sugerem que a alergia ao leite de vaca no Brasil seja responsável por 7% das diarreias encontradas na população pediátrica.

As manifestações clínicas mais comuns ligadas à alergia alimentar são as cutâneas, principalmente dermatite atópica e urticária, e as gastrintestinais mediadas ou não por IgE.<sup>4, 6</sup> A sensibilidade a alimentos também está associada ao desenvolvimento de asma, causa crescente de morbidez na população pediátrica.<sup>7, 8</sup> A Figura 2 relaciona a distribuição da sintomatologia da alergia alimentar por idade, para diferentes alérgenos.

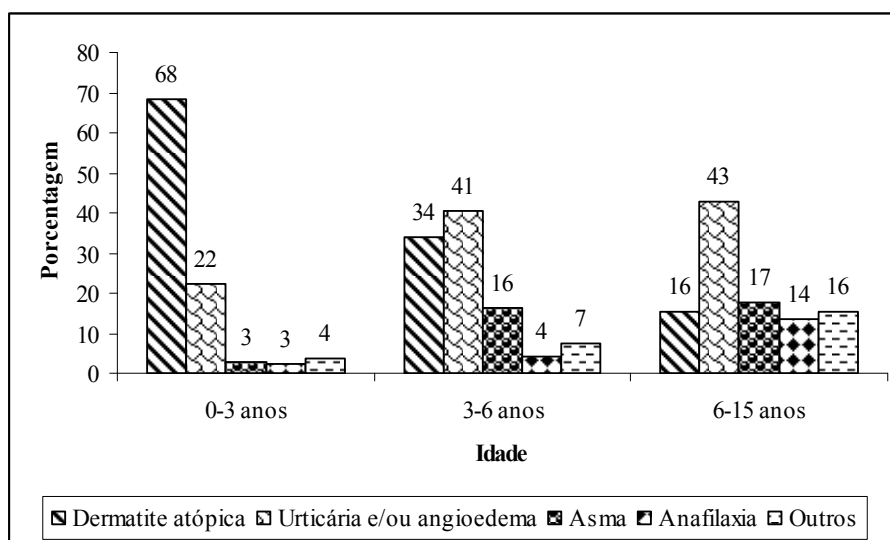


Figura 2 - Distribuição dos sintomas em indivíduos alérgicos.

Fonte: Rancé *et al.*<sup>4</sup>. Obs.: Outros: edema de laringe, distúrbios gastrintestinais e conjuntivite.

As reações do tipo imediato podem se manifestar de minutos até 2 horas após a ingestão do alimento e têm a participação de IgE; já as do tipo tardio, se manifestam de 2 a 48 horas ou mais após a ingestão e têm participação de linfócitos T citotóxicos, imunocomplexos, imunoglobulinas do tipo M e G (IgM e IgG), dentre outros.<sup>9, 10</sup>

Os sintomas da alergia alimentar são solucionados depois da proteína causal ser removida da dieta, mas pode haver recidiva, com um padrão de sintomas característico, em caso de re-exposição. Aproximadamente 2 horas depois da reintrodução do

alérgeno, ocorre vômito, seguido por elevação sérica de leucócitos polimorfonucleares, diarreia, letargia e hipotensão.<sup>11</sup> O choque anafilático é a consequência mais grave da alergia alimentar e sem tratamento imediato, a obstrução das vias aéreas e a baixa pressão arterial podem causar a redução drástica de oxigenação, irregularidade do pulso e possível colapso cardiovascular.<sup>12</sup>

Ainda hoje existe grande dificuldade no diagnóstico e cuidado nutricional dos pacientes alérgicos, principalmente pertencentes à população pediátrica por causa de sua vulnerabilidade. Talvez pela variabilidade nos sintomas ou por inadequada ou tardia investigação diagnóstica. Adicionalmente não existe um consenso sobre o cuidado nutricional destes pacientes no que tange ao tempo de eliminação/reintrodução do alimento na dieta e sobre as proteínas possivelmente hipoalergênicas.

Assim, esta revisão tem como objetivo apresentar uma discussão sobre as alergias alimentares, com foco principal no desafio do diagnóstico e no cuidado nutricional. Procurou-se detalhar as perspectivas de tratamento com as terapias imunomodulatórias e com probióticos e a importância do aleitamento materno exclusivo na diminuição da sensibilização precoce da população pediátrica.

## **DIAGNÓSTICO DA ALERGIA ALIMENTAR**

O diagnóstico de alergia alimentar deve contemplar a anamnese e o exame físico para identificação do quadro clínico, alimentos ingeridos, antecedentes familiares e fatores predisponentes ao seu desenvolvimento. Após o levantamento da hipótese diagnóstica pode-se solicitar dosagem sérica de IgE total e contagem de eosinófilos, que embora sejam marcadores de baixa sensibilidade, indicam a presença de alterações no sistema imunológico.<sup>6</sup>

Atualmente estão disponíveis diversos testes diagnósticos específicos para alimentos dentre eles o teste de puntura (TP) e o da dosagem de IgE específica para o alimento através da reação de imunoensaio (*Radio Allergo Sorbent Test* - RAST). No teste de puntura aplica-se e compara-se o extrato do alimento suspeito na diluição de 1:10 ou de 1:20 com duas soluções controles, uma negativa com salina e outra positiva com histamina. Quando a solução teste provoca uma pápula com diâmetro maior que aquela da solução salina, o teste é considerado positivo. Um teste negativo apenas exclui um mecanismo mediado por IgE.<sup>13</sup> Testes de puntura são muito sensíveis, mas

pouco específicos. Um diagnóstico preciso é primordial para o sucesso do tratamento da alergia alimentar. Pacientes com dermatite atópica apresentam uma sensibilidade ao TP de aproximadamente 90%, mas uma especificidade de 50%.<sup>8, 13</sup> Muitos alérgenos protéicos têm sido identificados, seqüenciados e clonados. Os alérgenos recombinantes estão sendo identificados atualmente para aplicabilidade no diagnóstico de doenças alérgicas. Eles oferecem segurança e especificidade superior em testes alérgicos embora sua sensibilidade seja geralmente menor que a dos extratos de alérgenos naturais.<sup>10</sup>

O RAST, apesar de mais específico, apresenta menor sensibilidade que o teste cutâneo, possuindo o ponto positivo de não causar maiores riscos para o indivíduo, principalmente naqueles com histórico de reação anafilática. Se a dosagem de IgE específica para o alimento suspeito, através da reação de imunoensaio, for negativa ela não exclui a possibilidade de reação de hipersensibilidade, pois níveis elevados de IgE específica são usualmente encontrados nas reações do tipo imediato.<sup>14</sup> Ambos, TP e RAST, são importantes na detecção de anticorpos IgE para um alimento específico, mas não estabelecem o diagnóstico de alergia alimentar, nem distinguem entre indivíduos que evoluirão com tolerância ao alimento ou aqueles que terão persistência da alergia.<sup>15</sup>

O desencadeamento cego controlado por placebo (DCCP) é considerado “padrão ouro” para o diagnóstico da alergia e é utilizado tanto na população pediátrica quanto na adulta, mas é contra indicado em casos de risco de anafilaxia sistêmica e só deve ser realizado em ambiente hospitalar.<sup>16</sup> Pode-se observar na Tabela 1, de acordo com Al Mushen *et al.*<sup>17</sup> a diferença entre sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo para testes diagnósticos, em casos de alergia alimentar a amendoim considerando-se TP, *Fluorescent allerge Sorbent Test* (FAST) e DCCP.

Tabela 1 – Comparação entre testes diagnósticos para alergia alimentar ao amendoim.

Teste diagnóstico	% Sensibilidade	% Especificidade	VPP	VPN
TP	> 95	30 – 6-	< 50	>95
FAST	57	100	100	36
DCCP	100	100	100	100

VPP (Valor preditivo positivo), VPN (Valor preditivo negativo). Fonte: Al Mushem *et al.* (2001)<sup>17</sup>

Na alergia alimentar onde predominam os sintomas gastrintestinais de início tardio, as reações aparecem em um período de tempo maior após um DCCP, assim o tempo de observação vai depender do tipo de reação da qual se suspeita. <sup>16, 18</sup> Resultados falso-negativos e falso-positivos são raramente relatados quando se utiliza um DCCP, os resultados falso-negativos podem ocorrer quando o teste é realizado com doses inadequadas do alimento, enquanto que os resultados falso-positivos podem acontecer se o teste for finalizado precocemente. A Figura 3 apresenta um resumo do processo investigativo da alergia alimentar considerando-se os possíveis testes diagnósticos.

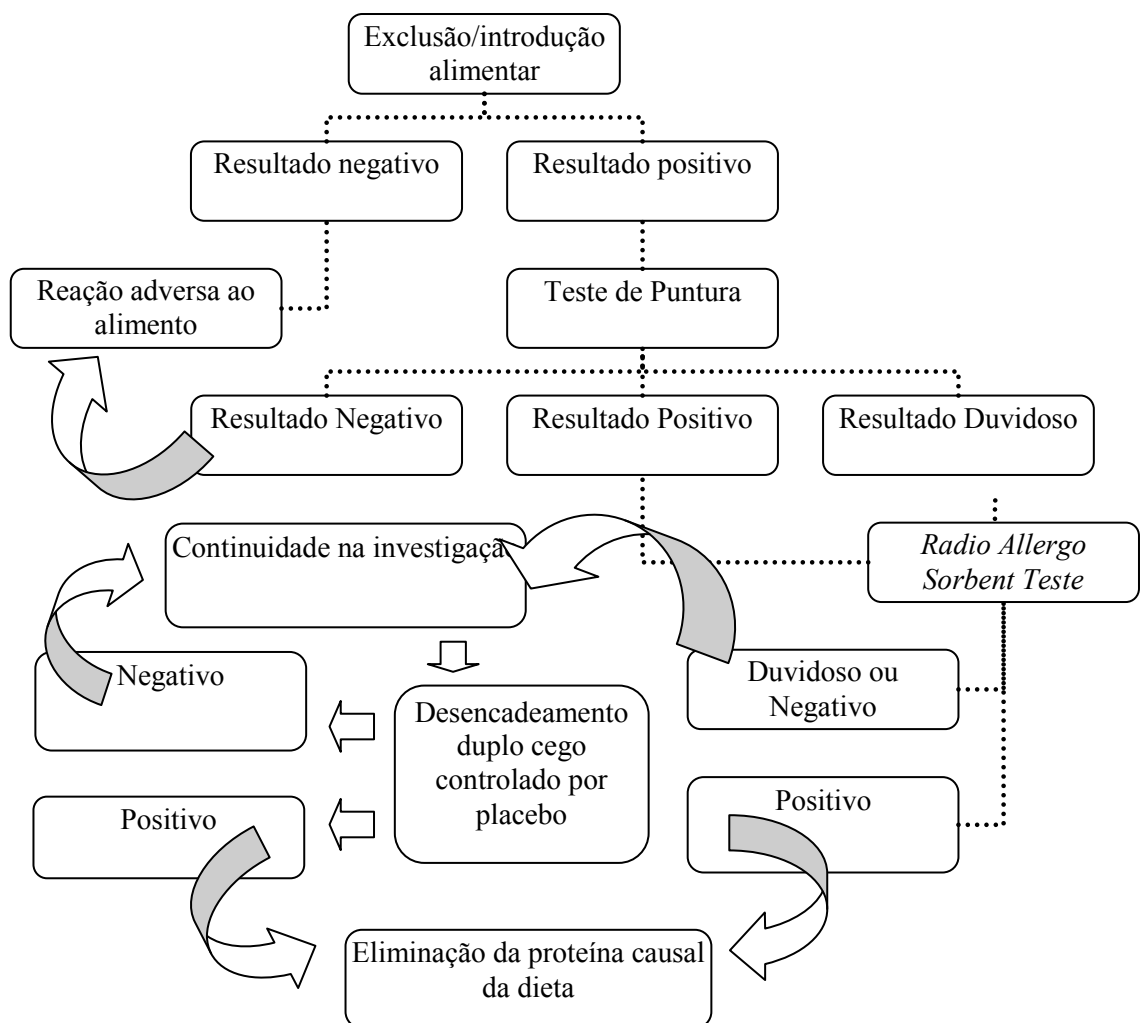


Figura 3 – Sequência diagnóstica na investigação da alergia alimentar.



## PRINCIPAIS ALÉRGENOS

Durante a primeira infância, na presença de predisposição genética, o alimento é o principal fator de hipersensibilidade. Em crianças mais velhas, podem-se encontrar respostas tardias ativadas localmente na mucosa gastrointestinal, acarretadas principalmente pelo leite de vaca, que contém mais de 25 proteínas distintas, potencialmente alergênicas. Possuem maior importância antigênica as lactoglobulinas  $\alpha$  e  $\beta$  e as caseínas  $\alpha$  S1,  $\alpha$  S2 e  $\kappa$  caseína.<sup>18</sup>

Rance *et al.*<sup>4</sup>, em estudo prospectivo na França encontraram cinco alimentos responsáveis por aproximadamente 78% dos sintomas de alergia alimentar em crianças de 0 a 15 anos. Dentre eles estavam o ovo com uma frequência de 36%, seguido do amendoim com 26%, leite de vaca com 8%, mostarda com 6% e bacalhau com 4%. Também é possível encontrar alergias desencadeadas por crustáceos, soja, trigo, carne bovina e suína além de frutas cítricas, sendo a prevalência destas manifestações diferente de acordo com o hábito alimentar da população.<sup>4, 18</sup> A maior parte dos alérgenos alimentares são hidrossolúveis, termo-resistentes e apresentam peso molecular variando entre 10 e 70 kDa.<sup>19</sup>

A incidência da alergia ao leite de vaca na população pediátrica varia entre 0,5 e 7,5%, mas aproximadamente 80% destas manifestam tolerância oral após o terceiro ano de vida.<sup>12</sup> Além da sintomatologia usual, vários autores relatam constipação intestinal como principal manifestação clínica dos casos de alergia ao leite de vaca.<sup>8</sup> Szepfalusi *et al.*<sup>20</sup> mostraram que dentre as crianças que apresentavam alergia ao leite de vaca, 15% tinham sua alergia mediada por IgE e tenderam a manter esta sensibilidade até a segunda década de vida e 35% apresentavam reações alérgicas a outros alimentos. É interessante ressaltar que grande parte dos indivíduos alérgicos ao leite de vaca apresenta negatividade para o TP e para o RAST.<sup>15</sup>

Estudos preliminares apontaram marcadores para a tolerância a alergia, por meio da identificação de elevados níveis de IgE específicas para proteínas, especialmente caseína e  $\beta$  lactoglobulina, em indivíduos com alergia persistente a leite, quando comparadas com aqueles que já haviam abandonado a patologia.<sup>20, 21</sup>

Os sítios de ligação da IgE ao alérgeno protéico podem consistir de segmentos consecutivos do aminoácido ou de diferentes partes da seqüência aminoacídica

mantidos juntos pela conformação protéica, conhecidos como determinantes antigênicos ou epitopos conformacionais.<sup>22,23</sup>

Chatchatee *et al.*<sup>24</sup> encontraram, em crianças com alergia persistente a leite, altos níveis IgE para epitopos seqüenciais de  $\alpha$  S1,  $\alpha$  S2 e  $\kappa$  caseína, sugerindo possibilidade da continuidade da alergia. Estas observações sugerem que talvez o reconhecimento de um epitopo diferencial seja uma característica geral da alergia alimentar e que estudos adicionais devem elucidar a utilidade diagnóstica de testes que detectam ligações para epitopos conformacionais e seqüenciais.

Aproximadamente 1,3% das crianças no Reino Unido e Estados Unidos manifestam reações alérgicas mediadas por IgE após ingestão de ovos. A clara do ovo possui cerca de 40 proteínas diferentes e a ovoalbumina (OVA) e o ovomucóide são os principais alérgenos.<sup>25</sup>

Cooke e Sampson<sup>26</sup> sugeriram que crianças com alergia a ovos, as quais desenvolveram significativa quantidade de IgE para a seqüência de epitopos do ovomucóide, foram passíveis de ter alergia persistente, enquanto que as crianças que desenvolveram predominante IgE para epitopos não seqüenciais foram passíveis de abandonar sua hipersensibilidade.

Friedman e Zeiger<sup>27</sup> realizaram um estudo com objetivo de determinar o aparecimento de OVA no leite materno e se a forma de consumo do mesmo interferia diretamente na concentração total excretada. Desta forma, 541 lactantes consumiram um café da manhã teste sem ovos, com ovos crus e com ovo completamente ou parcialmente cozido. Amostras do leite foram coletadas de hora em hora durante 8 horas e apresentaram dose-resposta: quanto maior o grau de cocção, maior o aparecimento de ovoalbumina no leite. Foram encontrados resquícios de OVA no leite materno até 8 h depois do consumo inicial. Como excreção de OVA em leite humano parece ser um fenômeno normal, estudos adicionais precisam determinar se existe correlação entre a excreção de ovoalbumina e a prevalência de alergia a ovos em crianças que fazem o aleitamento exclusivo.

Além da ovoalbumina, outros estudos também detectaram a presença de  $\beta$  lactoglobulina, caseína e mesmo globulina bovina em mulheres que não evitavam produtos de leite de vaca durante a lactação.<sup>28</sup> Alérgenos provenientes do amendoim e

do trigo também foram identificados em leite humano de 2 a 6 horas após a ingestão materna, sendo ainda encontrados após quatro dias.<sup>29, 30</sup>

Crianças atópicas sensibilizadas para estes alimentos podem ter exacerbação dos sintomas depois de ingerir leite materno que contenham estes alérgenos.<sup>30</sup> Embora esteja claro que estes antígenos possam ser encontrados no leite humano, é incerto afirmar que eles poderiam conduzir a uma sensibilização precoce ou mesmo produzir tolerância no recém nascido.

Apesar dos resultados controversos, o aleitamento materno ainda é tido como ponto positivo na prevenção do aparecimento de reações adversas, pois protege o lactente fornecendo anticorpos e retardando o contato com proteínas potencialmente alergênicas.<sup>31</sup>

Os pescados também possuem importância no que tange a alergia alimentar, mas não se conhece a estimativa mundial, pois sua ocorrência é maior em países com consumo elevado. Aproximadamente 39% dos pacientes alérgicos pediátricos noruegueses o são devido à ingestão de peixes.<sup>32</sup> As parvalbuminas são encontradas nos músculos de peixes e anfíbios e são apontadas como principais alérgenos destes alimentos. Hilger *et al.*<sup>32</sup> demonstraram que a  $\alpha$  parvalbumina foi a molécula implicada em um caso de choque anafilático provocado pela ingestão de carne de rã.

Hilger *et al.*<sup>33</sup> realizaram ainda um estudo cuja finalidade era testar a possibilidade de reatividade cruzada entre peixes e anfíbios em indivíduos alérgicos a bacalhau. Amostras sanguíneas destes pacientes foram analisadas por meio de testes *in vitro*. Três de treze amostras reagiram positivamente com  $\alpha$  parvalbumina e onze de doze reagiram com  $\beta$  parvalbumina da *Rana esculenta*, uma espécie selvagem de rã. Testes de puntura também foram realizados com parvalbumina recombinante em cinco indivíduos, três alérgicos a peixe e dois não alérgicos, obtendo resultados positivos nos alérgicos, o que comprova o risco da reatividade cruzada.

É frequentemente mencionado que a alergia a carne bovina raramente ocorre na infância, embora reações imunes adversas e alérgenos bovinos estejam correlacionadas a casos de dermatite atópica em crianças.<sup>14, 34</sup> A incidência de alergia a carne bovina aparece entre 0,3% da população geral.<sup>34</sup>

Sampson e MacCaskill<sup>35</sup> encontraram teste de puntura positivo para carne bovina em 18 indivíduos de um total de 113 crianças atópicas (15,9%), embora somente

duas (1,8%) tenham sido confirmadas por meio do DCCP. A albumina sérica bovina (BSA) é o alérgeno mais importante considerando-se carne bovina. Segundo Beretta *et al.*<sup>36</sup> as albuminas séricas também estão implicadas na alergia ao leite de vaca. Sampson<sup>37</sup> realizou estudo com 15 crianças com dermatite atópica, alérgicas a leite de vaca, e observou que duas (13,3%) obtiveram resultados positivos após DCCP com carne bovina.

Geralmente as crianças sensíveis a BSA são sensíveis também às albuminas séricas de carneiros (OSA) e outras albuminas; as carnes de peru e de rã podem ser substituídas, mas pouco se conhece sobre a reatividade cruzada entre estas fontes protéicas.<sup>38, 39</sup> Reações adversas para proteína de ovinos são relatadas por 50% dos alérgicos a carne bovina quando ingerem carne de carneiro.<sup>38</sup>

Nestes casos, o uso de carnes alternativas precisa de cuidado e avaliação individual sendo que nenhuma carne ou leite pode ser considerado hipoalergênico, pois a reatividade cruzada propõe um sério problema nutricional para crianças com alergia a alimentos e em particular nas polialérgicas.

Alimentos de origem vegetal também produzem hipersensibilidade alimentar e seu principal representante é o amendoim. A araquina e a conaraquina são as proteínas envolvidas na fisiopatologia. A alergia tende a persistir até a idade adulta e por vezes sua sintomatologia se torna mais severa com a idade; com frequência muito menor, a alergia ao amendoim se torna evidente pela primeira vez na idade adulta.<sup>40</sup>

## **PERSPECTIVAS PARA O CONTROLE DAS ALERGIAS**

A opção inicial de controle, no caso das alergias alimentares, é de exclusão do alérgeno da dieta e a verificação de reatividade cruzada entre outros alimentos. Mas para tal, é imprescindível o estabelecimento de um diagnóstico correto e da determinação da duração da dieta, já que em alguns casos ocorre remissão espontânea da sensibilidade. Essa medida acarreta um elevado custo à família, com risco de prejuízo no ganho pômbero-estatural, quando se trata de alergia ao leite, pois o custo das fórmulas lácteas hidrolisadas ou à base de soja é elevado.<sup>31</sup>

Nos últimos anos, houve grande avanço no conhecimento dos genes ligados à alergia. Muitos polimorfismos foram associados como marcadores genéticos para o fenótipo de atopia.<sup>20</sup> Embora alguns *loci* possam ser identificados em grande parte da

população com diagnóstico de alergia alimentar, outros parecem somente predizerem susceptibilidade dentro de determinados grupos étnicos.<sup>41</sup> Alguns genes implicados em polimorfismos, como possíveis marcadores de doença alérgica, incluem o 5q31 que codifica os genes para interleucina 4, 5, 9 e 13 (IL 4, IL5, IL 9, IL 13); o 11q13 que codifica a cadeia  $\beta$  do receptor de IgE de alta afinidade; o 6p21 e 12q, que codificam para o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), respectivamente.<sup>41, 42</sup>

O controle das alergias por meio de medicamentos ocorre com o uso de agentes adrenérgicos, anti-histamínicos, corticosteróides e inibidores da síntese de prostaglandinas. Mas neste caso, a medicação desempenha papel secundário e contribui no alívio dos sintomas, pois ainda não existe uma terapia eficaz para a cura da alergia alimentar.<sup>19</sup>

As terapias imunomodulatórias possuem ação de interferência na apresentação, na diferenciação ou no mecanismo efetor da resposta imunológica ao alérgeno, duas delas têm apresentado destaque nos últimos anos: a terapia com anticorpos humanizados e a utilização de probióticos.<sup>10, 42</sup> A terapia com anticorpos anti-IgE monoclonais humanizados baseia sua ação na interferência da ligação IgE-alérgeno-mastócito. Eles se ligam no terceiro domínio da região Fc das moléculas de IgE, ponto no qual a IgE se ligaria aos receptores de baixa afinidade (Fc $\epsilon$ RII) e de alta afinidade (Fc $\epsilon$ RI). Com a diminuição das moléculas de anticorpos disponíveis, a utilização de anti-IgE regula a expressão do receptor Fc $\epsilon$ RI nos mastócitos e basófilos e leva a uma conseqüente diminuição da liberação de histamina. Alguns autores têm demonstrado diminuição dos sintomas de asma e rinite alérgica e alegam possível proteção contra o choque anafilático.<sup>10, 43</sup>

O mecanismo de ação do uso de probióticos está associado à maior diferenciação das células T em Th1 em detrimento da Th2, ocasionando conseqüente aumento da imunoglobulina do tipo A (IgA), da interleucina 10 (IL 10) e supressão do fator TNF $\alpha$ . Majamaa e Isolauri<sup>43</sup> trataram crianças com hipersensibilidade a leite durante dois meses com *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* e demonstraram diminuição na gravidade dos sintomas de dermatite atópica. Em outro estudo, Ratauva *et al.*<sup>44</sup> selecionaram 159 gestantes com história própria, ou dos parceiros, de atopia. As voluntárias foram suplementadas aleatoriamente com *Lactobacillus GG* ou placebo até o sexto mês de lactação. Aos dois anos de idade, 23%

das crianças nascidas das mães suplementadas apresentaram algum grau de atopia, número inferior aos 46% das crianças nascidas das mães tratadas com placebo.

Apesar do avanço nas pesquisas e das novas técnicas propostas para o tratamento da alergia, vários estudos apontam para um nível primário de prevenção da alergia. Acredita-se na existência de situações de risco para a atopia potencializada pelo aleitamento não-exclusivo, introdução de alérgenos alimentares precocemente e uso materno durante a gestação e lactação de álcool drogas, incluindo o cigarro. Assim uma ação de prevenção estaria ligada à identificação de recém-nascidos de alto risco para o desenvolvimento da alergia e à adoção de medidas profiláticas no intuito de impedir a sensibilização precoce dos mesmos.

A Academia Americana de Pediatria e a Sociedade Européia de Alergologia Pediátrica recomendam a utilização da história familiar de atopia para a identificação e prevenção da alergia alimentar, uma vez que identificados precocemente medidas preventivas poderiam ser tomadas (Quadro 1).<sup>45</sup>

Quadro 1 - Níveis primários de prevenção recomendados pela Academia Americana de Pediatria.

Parâmetro	Considerações	Observações
Alimentação materna durante a gestação	De modo geral, não são recomendadas restrições	Considerar o amendoim uma exceção
<i>Screening</i> para recém-nascidos de alto risco para atopia	Dois membros na família com sinais de atopia, seja ela bi ou unilateral	
Aleitamento exclusivo	Duração mínima de 6 meses	Em impossibilidade, utilizar fórmulas com reduzida alergenicidade
Alimentação materna durante a lactação	Exclusão de amendoim, leite de vaca, ovos e peixe nos casos de indivíduos de risco	Considerar suplementação vitamínica, mineral e protéica
Introdução da alimentação complementar	Retardar a introdução de alimentos potencialmente alergênicos	Considerar a introdução de leite de vaca aos 12 meses, de ovos aos 24 meses e de pescado aos 36 meses

Assim estratégias de prevenção primária ao aparecimento das alergias apresentam-se promissoras uma vez que o tratamento das alergias ainda se mantém no âmbito sintomático.

## CONCLUSÃO

A incidência de doenças alérgicas tem aumentado a cada ano. Apesar de ser considerada baixa quando comparada a outras patologias na população em geral, não deve ser analisada com menor importância. Idade, hereditariedade, precocidade no contato com antígenos, estado imunológico do indivíduo e potencial alergênico do alimento são os principais fatores predisponentes à alergia.

Apesar dos testes diagnósticos disponíveis, é preciso ampliar os horizontes e as pesquisas na busca de novas possibilidades de cura para a alergia. Dentro desta perspectiva inclui-se o aperfeiçoamento dos testes *in vitro* para predição da evolução da patologia. O aleitamento materno exclusivo é ainda a melhor maneira de prevenção, uma vez que dificulta o contato com possíveis alérgenos alimentares, pelo menos até que ocorra maturação completa das vilosidades intestinais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rancé F, Kanny G, Dutau, G, Moneret-Vautrin, DA. Food hypersensitivity in children: clinical aspects and distribution of allergens. *Pediatr. Allergy Immunol.* 1999; 10: 33-38.
2. Host A, Koletzko B, Dreborg S. Joint Statement of the European Society for Pediatric allergology and Clinical Immunology Committee on Hypoallergenic Formulas and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Committee on Nutrition. Dietary Products used in infants for treatment and prevention of food allergy. *Arch. Dis. Child.* 1999; 81: 80-84.
3. Ebisawa M, Sugizaki C, Ikeda Y, Tachimoto H. Prevalence of food allergy during infancy in Japan. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 115(S245): 950-951.
4. Rancé F, Kanny G, Dutau G, Moneret-Valtrin DA. Food hypersensitivity in children: clinical aspects and distribution of allergens. *Pediatr. Allergy Immunol.* 1999; 10: 33-38.

5. Sabra, AMC, Santalucia GM, Gracia J. Intolerância à proteína heteróloga. *In*: Sabra, AMC: Tubo digestivo em pediatria. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1986. p 83-86.
6. Mofidi S. Nutritional management of pediatric food hypersensitivity. *Allergy* 1999; 54: 352-357.
7. Wang J, Visness C, Sampson HA. Food allergen sensibilitization in inner city asthmatic children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 7: 352-355.
8. Host A, Halken S, Jacobsen HP, Christensen AE, Herskind AM, Plesner K. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2002; 13 (15): 23-28.
9. Ledue G, Kemeulemester C, Polack B, Guizard C, Le Guern L, Peetre G. Immunochemical detection of egg-white antigens and allergens in meat products. *Allergy* 1999; 54: 464-472.
10. Nowak-Wegrzyn A. Future approaches to food allergy. *Pediatrics* 2003; 111 (06): 1672-1680.
11. Marcucci F, Frati F, Sensi L, Cara GD, Novembre E, Bernadini R, Canonica GW, Passalacqua G. Evaluation of food-pollen cross-reactivity by nose-mouth cross-challenge in pollinosis with oral allergy syndrome. *Allergy* 2005; 60: 501-505.
12. Businco L, Cantani A, Longhi MA, Giampietro PG. Anaphylactic reactions to a cow's milk whey protein hidrolysate (Alfa-Re, Nestle) in infants with cow milk allergy. *Ann. Allergy.* 1989; 62: 333-335.
13. Sampson HA. Update of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 113: 805-819.



14. Sampson HA, Ho DG. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997; 100: 444-51.
15. Docena G, Rozenfeld P, Fernández R, Fossat CA. Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests. *Allergy* 2002; 57: 83-91.
16. Sampson HA. Role of immediate hypersensitivity in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Allergy* 1989; 44 (9): 52-58.
17. Al Mushen S, Clarke AE, Rhoda SK. Peanut allergy: an overview. *CMAJ* 13, 2003; 168 (10): 1279-1285.
18. Sabbah A. L'allergie alimentaire dans l'asthme de l'enfant. *Allergie Immunol.* 1990; 22: 325-330.
19. Martins ER. Alergia Alimentar. *In: Rios JBM e Carvalho LP. Alergia Clínica - Diagnóstico e Tratamento. São Paulo: Revinter; 1995. p. 405-423.*
20. Spepfalusi Z, Nentwich I, Gerstmayr M. Prenatal allergen contact with milk proteins. *Clin. Exp. Allergy* 1997; 27: 28-35.
21. Hill DJ, Bael G, Hosking CS. Clinical manifestations of cow's milk allergy in childhood association with in vitro cellular immune responses. *Clin. Allergy* 1988; 18: 469-479.
22. Vila L, Beyer K, Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clin. Esp. Allergy.* 2001; 31: 1599-1606.

23. Mittag D, Akkerdaas J, Ballmer-Weber BK, Vogel L, Wensing M, Wolf-Meinhard B, Koppelman SJ, Knulst AC, Helbling A, Hefle SL, Van Ree R, Vieths S. Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 114: 1410-1417.
24. Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA. Identification of IgE and IgG binding epitopes of alpha s1-casein in cow's milk allergic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 105: 185-191.
25. Palmer DJ, Gold MS, Makrides M. Effect of cooked and raw egg consumption on ovalbumin content of human milk: a randomized double-blind, cross over trial. *Clin. Exp. Allergy* 2005; 35: 173-178.
26. Cooke SK, Sampson HA. Allergenic properties of ovomucoid in man. *J. Immunol.* 1997; 159: 2026-2032.
27. Friedman, NJ; Zeiger, RS. The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115 (6): 1238-1248.
28. Troncone R, Scarcella A, Donatiello A, Camataro P, Taratreso A, Auricchio S. Passage of gliadin into human breast milk. *Acta Paediatr. Scand.* 1987; 76: 453-456.
29. Vadas P, Wai Y, Burks W, Perlman B. Detection of peanut allergen in breast milk of lactating women. *JAMA* 2001; 285: 1746-1752.
30. Stuart CA, Twiselton R, Nicholas MK, Hide DW. Passage of cow's milk protein in breast milk. *Clinic. Allergy* 1984; 14: 533-535.
31. Fomon SJ. Infant feeding in the 20<sup>th</sup> century: formula and beikost. *J. Nutr.* 2001; 131: 409-420.

32. Hilger C, Grigioni F, Thill L, Mertens L, Hentges F. Severe IgE-mediated anafilaxis following consumption of fried frog legs: definition of  $\alpha$  parvalbumin as the allergen in cause. *Allergy* 2002; 57: 1053-1058.
33. Hilger C, Thill L, Grigioni F, Lehnert C, Falagiani P, Ferrara A, Romano C, Stevens W, Hentges F. IgE antibodies of fish allergic patients cross-react with frog parvalbumin. *Allergy* 2004; 59: 653-660.
34. Fiocchi A, Restani P, Riva E. Beef allergy in children. *Nutrition* 2000; 16 (6): 454-457.
35. Sampson, HA, McCaskill CC. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. *J. Pediatric*. 1985; 107: 669-675.
36. Beretta B, Conti A, Fiocchi A. Antigenic determinants of bovine serum albumin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2001; 126: 188-195.
37. Sampson HA. Food allergy: when mucosal immunity goes wrong. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115: 139-141.
38. De Luca L, Santoro L. Profilassi e terapia dietetica con latte di carne di agnello in 26 bambini poliallergici alimentari con dieta a multipla esclusione durante terapia intensiva o di mantenimento post-diagnostico. *Pediatr. Med. Chir.* 1987; 9: 449-455.
39. Sabrá A, Del Castilho R, Sabrá S, Madi K. Tratamento da Alergia Alimentar. *In: Sabrá A, Del Castilho R, Sabrá S, Madi K. Temas de Pediatria.* Nestlé, 1995. p. 46-51.
40. Vander Leek TK, Liu AH, Stefanski K, Balcker B, Bock SA. The natural history of peanut allergy in young children and its association with serum peanut-specific IgE. *J. Pediatr.* 2000; 137: 749-755.

41. Barnes KG. Atopy and asthma genes: where do we stand? *Allergy* 2000; 55: 803-817.
42. Robinet E, Stamm C, Nicolas JF, et al. CD4 monoclonal antibody administration in atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1997; 36: 582-588.
43. Majamaa H, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997; 99: 179-185.
44. Ratauva S, Kalliomaki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109: 119-121.
45. American Academy of Pediatrics, Work Group on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 1997; 100: 1035-1039.

## CAPÍTULO 2

### DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DA CARNE DE RÃ, CARNE DE BOI E DO LEITE SUBMETIDOS A DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS

#### RESUMO

Durante os primeiros anos de vida, na presença de predisposição genética, o alimento é o principal fator de hipersensibilidade. Em crianças mais velhas, podem ser encontradas respostas tardias ativadas localmente na mucosa gastrintestinal induzidas principalmente pelo leite de vaca. Embora o alimento causador de alergia alimentar mais freqüente seja o leite de vaca, também existe considerável incidência de casos de alergias desencadeados pelo consumo de ovos, pescados, frutos do mar, soja, amendoim, trigo, carne bovina e suína.

Diversos estudos têm associado à digestibilidade das proteínas ao seu potencial imunogênico. Nesse sentido, objetivou-se avaliar o impacto do processamento térmico com elevadas e baixas temperaturas sobre a estrutura protéica de três alimentos, por meio da digestibilidade *in vitro* e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE). Observou-se que tanto a pasteurização, cocção a 95°C durante 15 minutos, quanto liofilização ocasionaram modificações qualitativa e quantitativa das proteínas constituintes do alimento. As proteínas mais sensíveis ao processamento térmico em ordem crescente foram a carne bovina, a carne de rã e por último o leite de vaca.

**Palavras-chave:** processamento térmico, digestibilidade, alergenicidade.

## ABSTRACT

During the first years of life, in genetic predisposition, the food is the main factor of hypersensitivity; in older children, locally activated delayed answers can be found in the gastrointestinal mucosa mainly for the cow milk.

Although the more frequent food allergy causing element of more frequent food allergy is the cow milk, also considerable incidence of cases of allergies exists unchained for the consumption of eggs, fished, sea food, soy, peanuts, wheat, beef and pork meat.

Several studies have associated the digestibility of proteins to its immunogenic potential. Though, it was objectified to evaluate the impact of the thermal processing with high and low temperatures on the proteins structure of three types of foods, by means of the digestibility in vitro and SDS-PAGE.

The pasteurize was observed in such a way, firing 95°C during 15 minutes, how much freeze-drying causes qualitative and quantitative modifications of constituent proteins of the food. The most sensible proteins to the increasing thermal processing order were beef, frog meat, and the last, cow milk.

**Keywords:** thermal treatment, digestibility, allergenicity.

## INTRODUÇÃO

O processamento térmico é utilizado para melhorar a qualidade dos alimentos com relação à segurança microbiológica, seja pela eliminação de microorganismos ou toxinas, ou mesmo pela melhoria do valor nutricional decorrente do aumento na digestibilidade.<sup>1</sup>

Significativas alterações ocorrem na estrutura terciária das proteínas, durante o tratamento térmico. A natureza e extensão das mudanças dependem da temperatura e da duração do processamento térmico, assim como das características intrínsecas da proteína e das condições físico-químicas envolvidas.<sup>1</sup> Vários alérgenos encontrados nos alimentos são resistentes ao calor e estáveis à digestão realizada no trato gastrointestinal, levando alguns pesquisadores a correlacionarem o potencial alergênico de alguns alimentos à sua estabilidade a ação de enzimas proteolíticas.<sup>1,2</sup>

Além da desnaturação, outras modificações covalentes decorrentes do calor ou do armazenamento de produtos alimentícios podem levar à alteração na alergenicidade dos alimentos. Pode-se citar neste caso as reações de oxidação lipídica ou a oxidação direta ocasionada por intermediários reativos de oxigênio.<sup>3</sup>

Reações alérgicas induzidas por alimentos são responsáveis por uma variedade de sintomas envolvendo os sistemas gastrointestinal, respiratório e pele e podem ser causadas por mecanismos mediados ou não por imunoglobulinas do tipo E (IgE).<sup>4</sup> Qualquer alimento pode provocar uma reação alérgica na presença de susceptibilidade genética, mas efetivamente, poucos são realmente responsáveis pela maioria das reações. Dentre eles cita-se o leite de vaca, ovos, pescado, frutos do mar, amendoim, soja, trigo, carne bovina, suína e algumas frutas cítricas<sup>4, 5, 6, 7, 8</sup>

Estudos sugerem que cerca de 2% da população adulta no mundo apresentem hipersensibilidade alimentar, sendo 1% alergia alimentar propriamente dita; os números são em geral maiores para crianças com menos de três anos de idade, variando entre 6% e 8%.<sup>1,2</sup>

Normalmente, a alergenicidade de frutas frescas pode ser reduzida facilmente por meio da aplicação de tratamento térmico, permitindo à indústria alimentar a produção de alimentos seguros no que tange à alergia.<sup>9</sup>

Para avaliar a influência do processamento térmico sobre a reatividade clínica da alergia, Fiocchi *et al.*<sup>10</sup> compararam os efeitos da cocção doméstica e do processamento

industrial utilizando teste de puntura (TP) e de desencadeamento cego controlado por placebo (DCCP) em crianças institucionalizadas. No primeiro teste, extrato de carne processada industrialmente foi solubilizado em glicerol (50%) e comparado com extratos de carne bovina crua, cozida e pulverizado (*freeze-dried*) tendo como controle positivo albumina sérica bovina (BSA) purificada; foram identificadas 10 crianças positivas para pelo menos 03 dos itens testados. Num segundo momento estes mesmos indivíduos participaram do DCCP, para carne bovina processada industrialmente, cozida no vapor por 5 minutos a 100 °C, crua liofilizada e BSA purificada, utilizando carne de peru como placebo. O protocolo utilizava uma dose inicial de 12 g, sendo dobrada a cada 30 minutos (24, 48 e 96 g do alimento teste ou placebo) por 4 horas e descontinuada às primeiras manifestações de sintomas ou de resposta negativas depois da oitava dose. Foram encontradas respostas positivas somente para a BSA purificada em 50% dos indivíduos, que manifestaram rinite, angioedema, urticária e asma; evidenciando assim que o tratamento térmico é capaz de diminuir a alergenicidade de uma proteína.

Os sítios de ligação da IgE ao alérgeno protéico podem consistir de segmentos consecutivos do aminoácido ou de diferentes partes da seqüência aminoacídica mantidos juntos pela conformação protéica, são os chamados determinantes antigênicos conformacionais.<sup>11</sup> Alguns determinantes antigênicos são acessíveis nas proteínas nativas e se perdem quando elas são desnaturadas, outros são expostos quando a proteína se desdobra e ainda existem alguns determinantes que surgem de modificações covalentes ocasionadas pela quebra das ligações peptídicas.<sup>12</sup> Para alguns pesquisadores a ação peptídica é capaz de influenciar a alergenicidade das albuminas séricas clivando seqüências aminoacídicas e tornando um alérgeno em uma proteína não alergênica.<sup>2</sup>

Processamentos industriais fundamentados em baixas temperaturas também podem modificar a estrutura protéica dos alimentos já que a capacidade de formação de pontes de hidrogênio entre proteínas e água está reduzida.<sup>1</sup> A liofilização é o método mais comumente utilizado para a preparação de proteínas desidratadas, as quais devem apresentar estabilidade adequada por longo período de armazenagem em temperaturas ambientes.<sup>6</sup> A liofilização engloba basicamente três etapas: congelamento, secagem primária e secundária. O congelamento interrompe reações químicas e possíveis atividades biológicas na amostra. O material, previamente congelado, é desidratado por



sublimação seguida pela dessorção, utilizando-se baixas temperaturas de secagem a pressões reduzidas.<sup>13,14</sup>

Nesse sentido, objetivou-se avaliar o impacto do processamento térmico com elevadas e baixas temperaturas sobre a estrutura protéica de três alimentos, por meio da digestibilidade *in vitro* e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

As amostras analisadas foram selecionadas de forma a compará-las com relação à estabilidade de cada uma ao processamento térmico.

Para as análises, utilizou-se amostra de carnes de rã e bovina cozidas e cruas liofilizadas e leite de vaca *in natura*, *in natura* liofilizado, pasteurizado e em pó, processado industrialmente.

A carne de rã é citada na literatura como possível fonte protéica substituta na dieta de indivíduos alérgicos, apesar da escassez de estudos que abordem sua utilização.<sup>15, 16</sup> A carne bovina apresenta baixa incidência de alergia, enquanto que o leite de vaca possui mais de 25 proteínas distintas e potencialmente antigênicas. Dentre elas as lactoglobulinas  $\alpha$  e  $\beta$  e as caseínas  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2 e  $\kappa$ , sendo esta reconhecidamente alergênica, quando ingerida por indivíduos susceptíveis. A incidência da alergia ao leite de vaca na população pediátrica é de 0,5 a 7,5%.<sup>17, 18</sup>

### ***Obtenção e preparo das amostras***

O leite *in natura* e o pasteurizado foram adquiridos na Cooperativa de Laticínios da Universidade Federal de Viçosa (UFV), a carne de rã foi proveniente do Ranário da UFV, enquanto que o leite em pó e a carne bovina foram adquiridos no comércio local.

As amostras cárneas, tanto bovina quanto de rã, foram processadas de forma a simular o tratamento térmico doméstico (TT), no Laboratório de Estudo Experimental dos Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde, a uma temperatura de 95°C durante 15 minutos. Posteriormente, as amostras destinadas a digestibilidade *in vitro*, foram ainda submetidas ainda à desidratação em estufa a 65 °C durante 4 horas.

Para as amostras lácteas, não foram utilizados tratamentos térmicos adicionais ao processamento industrial.

### ***Teor de proteínas***

Para a determinação do teor de nitrogênio as amostras foram analisadas por meio do método semimicro Kjeldhal, conforme normas da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) <sup>19</sup>.

### ***Digestibilidade in vitro***

Avaliou-se a digestibilidade *in vitro* pelo método descrito por Hsu *et al.*<sup>20</sup> (1977), onde a digestibilidade é caracterizada pela queda de pH da solução de proteínas medida nos primeiros 15 segundos e posteriormente minuto a minuto durante 10 minutos após adição de solução enzimática.

As amostras foram suspensas em água destilada, 6,25 g de proteína/mL, com pH final igual a 8, sob agitação em banho-maria a 37 °C. Para a hidrólise das amostras preparadas utilizou-se 5 mL da solução enzimática contendo 2,5 mg/mL de tripsina e 1,6 mg/mL de pancreatina.

Para o cálculo da porcentagem de digestibilidade (%D), foram utilizadas as equações descritas por Pires *et al.*<sup>21</sup> provenientes da correlação entre valores observados em análises *in vitro* com experimentos *in vivo*.

### ***Eletroforese em gel de poliacrilamida***

Para a realização deste experimento as carnes de rã e bovina cruas, foram submetidas a TT, posteriormente a carne de rã e de boi cozidas, carne de rã e de boi cruas liofilizadas, o leite de vaca *in natura*, o *in natura* liofilizado, o pasteurizado e em pó obtido através de processamento industrial foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A eletroforese foi executada conforme Laemmli (1970).<sup>22</sup>

As amostras sólidas foram maceradas em 200 µL de tampão de lise (TL) até completa dissolução, com exceção da amostra liofilizada, esta por sua vez, antes da maceração foi suspensa em 100 µL de água destilada e deionizada. Posteriormente as amostras sólidas foram submetidas à centrifugação (Centrifuge 5415 C - *Eppendorf*) por 2 minutos a 14000 rpm, o sobrenadante foi retirado e utilizado posteriormente. Enquanto que as amostras líquidas foram adicionadas de água destilada e deionizada.

Posteriormente, uma alíquota de 100 µL foi retirada de cada amostra já preparada e adicionada de 100 µL do tampão da amostra (TA) duas vezes concentrado. Após pequena homogeneização foram submetidas a banho-maria fervente por 2 minutos.

Em cada “*slott*” foram aplicados 10 µL de amostra, a eletroforese ocorreu a 10mA por 17 horas. Utilizou-se um padrão marcador para proteínas de baixo peso molecular (MoBiTec®) com valores extremos de 116 kDa e 14 kDa.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se o software Statistics por análise de variância, com a utilização do teste de médias Duncan ou teste *t* Student, quando apropriado, com um nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparando-se o teor de proteínas nas amostras estudadas (Tabela 1) verificou-se diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras tratadas termicamente, por meio de cocção e desidratação daquelas em estado *in natura*. Quando separados em grupo tratado e não tratado termicamente, não se encontrou diferença estatisticamente significativa para a composição protéica das amostras.

Tabela 1 - Teores de proteínas nas amostras analisadas.

Fonte	g/100g
Carne de boi cozida e desidratada	88,26
Carne de rã cozida e desidratada	87,32
Carne de boi crua liofilizada	86,30
Carne de rã crua liofilizada	83,70
Leite em pó	33,12
Leite <i>in natura</i> liofilizado	25,09
Carne de boi crua	21,09
Carne de rã crua	17,09

Os resultados são expressos como médias de três repetições

A digestibilidade é a determinação da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos, ou de qualquer outro composto nitrogenado pelo organismo, sendo também um determinante da qualidade protéica da dieta.<sup>21</sup> Os métodos para determinação da digestibilidade *in vitro* se baseiam na digestão da amostra com enzimas proteolíticas em condições padronizadas.

A digestibilidade protéica tem sido rotineiramente avaliada em procedimentos que visam investigar a segurança de novas proteínas oriundas de organismos geneticamente modificados (OGM), mas também apresenta grande valia na pesquisa da influência do tratamento térmico sobre o potencial alergênico de muitos alimentos, dentre outras aplicações.<sup>23</sup>

Pode-se observar (Figura 1) que a queda no pH mais drástica acontece até o segundo minuto para todas as amostras, e segue mais lentamente até o décimo minuto. Este fato é decorrente da maior sensibilidade das proteínas desnaturadas à ação das enzimas proteolíticas, assim o rompimento das ligações peptídicas e pontes de hidrogênio tende a modificar o pH do meio, pois expõe a carga dos aminoácidos ácidos. A partir daí, a reação ocorre em cascata uma vez que as proteínas são sensíveis ao pH da solução na qual se encontram dissolvidas.

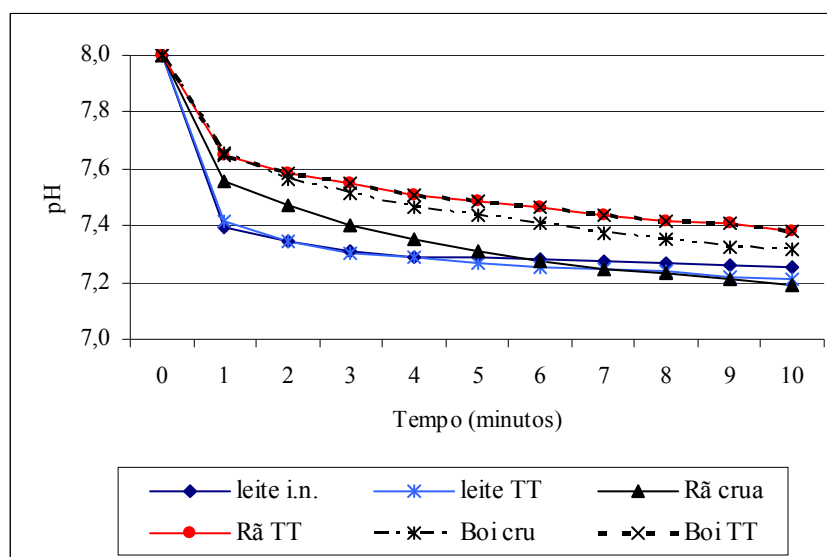


Figura 1 – Resultado da análise pelo método de queda de pH após adição da solução enzimática em amostras de leite in natura liofilizado (leite i.n.), leite em pó (leite TT), carne de rã crua, carne de rã cozida (Rã TT), carne de boi crua e carne de boi cozida (Boi TT).

Os resultados encontrados para a digestão *in vitro* das amostras *in natura* liofilizadas e tratadas termicamente (Figura 2) não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ). Talvez pelo fato das modificações apresentadas pela liofilização quanto pela cocção causarem nas proteínas. É sabido que proteínas sofrem desnaturação, às vezes de forma irreversível, por meio de numerosos eventos que afetam sua estabilidade, dentre eles o aquecimento, agitação, congelamento, pH além da exposição ou interfaces com agentes desnaturantes.<sup>24</sup>

De modo geral, os valores encontrados para porcentagem de digestibilidade (Figura 2) variaram entre 80%, considerando leite em pó, e 69% para carne bovina tratada termicamente.

O processamento dos alimentos pode melhorar o sabor e a textura dos alimentos; além de inativar fatores antinutricionais. No entanto, pode também alterar a estrutura primária das proteínas levando à oxidação de aminoácidos sulfurados e a ligações cruzadas entre peptídeos acarretando diminuição da biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais.<sup>3,1</sup>

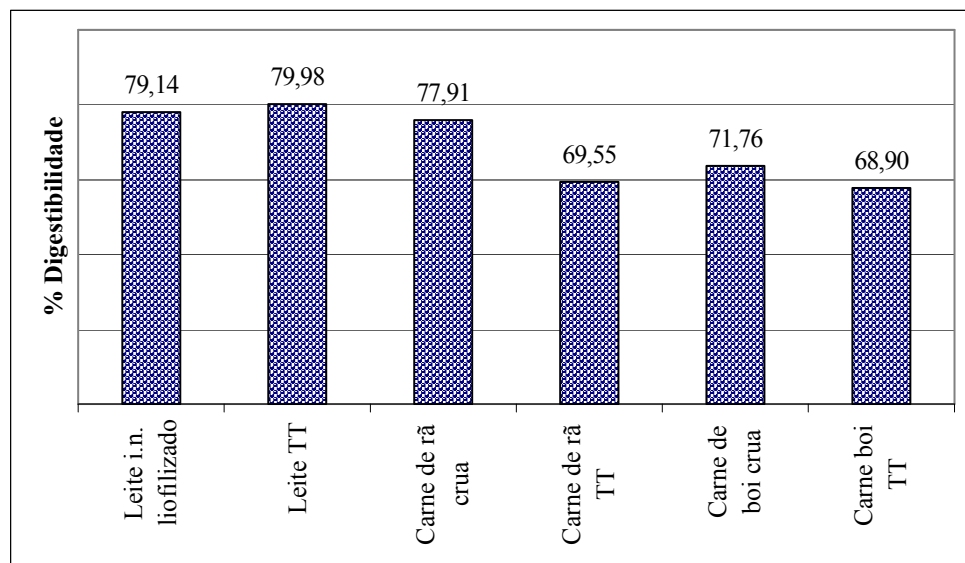


Figura 2 - Valores da digestibilidade *in vitro* obtidos por meio das equações polinomiais. Para amostras lácteas  $\%D = -32,841pH^2 + 434,01pH - 1337,7$  e para amostras cárneas  $\%D = -230pH^2 + 3270,9pH - 11505$ .

Tanto tratamento térmico quanto à armazenagem prolongada dos alimentos podem promover efeitos deletérios sobre a qualidade nutricional das proteínas. As modificações do valor nutritivo incluem o decréscimo da digestibilidade protéica, redução da biodisponibilidade da lisina e de outros aminoácidos essenciais e mesmo, possivelmente, a formação de substâncias que podem ser inibidoras do crescimento ou tóxicas, como por exemplo, a lisino-alanina. Pelo menos dois mecanismos estão envolvidos na diminuição da qualidade protéica dentre eles: o bloqueio de uma das cadeias aminoacídicas laterais e a formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas por condensação.<sup>1, 25, 26</sup>

Ainda assim, os valores encontrados para digestibilidade *in vitro* (Figura 2) estão dentro do esperado para proteínas de origem animal, uma vez que os valores encontrados para análises de digestibilidade *in vitro* são usualmente menores que os encontrados para análises de qualidade protéica realizadas em experimentos com animais.<sup>27</sup>

Restani *et al.*<sup>28</sup> investigaram diferentes padrões relacionados à digestão *in vitro* de albuminas em seu potencial alergênico, encontraram que após 5 minutos da ação de proteases ocorria uma redução estatisticamente significativa na positividade de testes de puntura realizados para BSA e albumina sérica ovina (OSA), quando comparada com o mesmo teste realizado com as proteínas em sua forma nativa.

Utilizou-se para cálculo aproximado para valores de peso molecular (PM) das bandas protéicas a correlação entre o PM e a distância percorrida pelas proteínas do marcador por meio da equação  $y = -0,0699x + 2,1663$ .<sup>22</sup>

Observa-se na Figura 4 o comportamento protéico eletroforético das amostras cárneas e lácteas analisadas em SDS-PAGE de acordo com os diferentes tratamentos térmicos administrados.

Considerando-se a carne de rã e os diferentes tratamentos aos quais foi submetida, linhas 1, 2 e 3, observa-se que as proteínas de baixo PM aparentemente não foram clivadas, mantendo-se intactas quando submetidas à cocção ou liofilização. Todas as proteínas menores que 28 kDa mantiveram-se estáveis tanto na cocção a 95 °C durante 15 minutos, quanto liofilizadas ou mesmo ausência de tratamento.

A liofilização pode causar diversas mudanças estruturais no espectro das proteínas. Estudos recentes com espectroscopia no infravermelho têm documentado que



principais alérgenos destes alimentos. Hilger *et al.*<sup>30</sup> demonstraram a implicação da  $\alpha$  parvalbumina em um caso de choque anafilático provocado pela ingestão de carne de rã processada termicamente.

Hilger *et al.*<sup>31</sup> também realizaram um estudo com a finalidade de testar a possibilidade de reatividade cruzada entre peixes e anfíbios em indivíduos alérgicos a bacalhau. Amostras sanguíneas destes pacientes foram analisadas por meio de testes *in vitro*, três de treze amostras reagiram positivamente com  $\alpha$  parvalbumina e onze de doze reagiram com  $\beta$  parvalbumina da *Rana esculenta*. Testes de puntura também foram realizados com parvalbumina recombinante em 5 indivíduos (três alérgicos a peixe e dois não alérgicos) e obtiveram resultados positivos nos alérgicos, o que comprova o risco da reatividade cruzada.

Verifica-se ainda na Figura 4, linhas 1 e 2, que as proteínas de alto PM mantiveram-se praticamente inalteradas quando submetidas aos tratamentos. No entanto as proteínas com PM aproximados de 56 e 50 kDa, se mostraram aparentemente suscetíveis à clivagem quando submetidas à cocção se comparadas à liofilização ou mesmo ausência de tratamento.

Bernhisel-Broadbent *et al.*<sup>32</sup> realizaram também uma investigação em SDS-PAGE com extratos de salmão e atum, e o resultado mostrou notável perda de frações protéicas quando comparadas amostras cárneas de salmão e atum processados industrialmente com extratos crus ou cozidos convencionalmente. Adicionalmente, confirmou-se a diminuição da alergenicidade por meio do DCCP em dois pacientes alérgicos a salmão.

A resistência ao TT das proteínas de baixo PM da carne de rã sugere que sua ingestão cozida, liofilizada ou crua, por indivíduos geneticamente predispostos, pode desenvolver reações alérgicas.

A análise das amostras de carne bovina, pelo mesmo método e submetidas aos mesmos tratamentos evidenciou suscetibilidade protéica à clivagem desencadeada pela cocção (linha 4) tanto para proteínas de baixo quanto de alto peso molecular, sendo que as proteínas intermediárias mantiveram-se inalteradas. Mesmo com a liofilização (linha 5) observa-se a ausência das bandas protéicas com PM acima de 116 kDa com aproximadamente 125, 111 e 108 kDa quando comparada à amostra *in natura*.



A proteína de maior importância nos casos diagnosticados de alergia alimentar à carne de vaca é a albumina sérica bovina (BSA), que apresenta peso molecular de 66 kDa.<sup>33</sup> Segundo Beretta *et al.*<sup>34</sup> esta e outras albuminas séricas, também estão implicadas em casos de reatividade cruzada com leite de vaca.

Sampson<sup>35</sup> em um estudo sobre alergia a carne bovina em crianças com dermatite atópica, após aplicar o TP encontrou resultado positivo em 15,9% delas, mas após o DCCP só foram confirmados 1,8% dos casos, Werfel *et al.*<sup>36</sup> obtiveram positividade para alergia ao leite de vaca em 84% das crianças estudadas através de TP e após a DCCP foi confirmada em apenas 20%. Muitas crianças com TP positivos para carne são clinicamente tolerantes a vários tipos de carnes por causa da digestão enzimática, que pode modificar as características estruturais de alguns alérgenos alimentares.

Geralmente as crianças sensíveis a BSA são sensíveis também a OSA e outras albuminas; o carneiro e o peru são sugestões de substitutos, mas pouco se conhece sobre a reatividade cruzada entre estas fontes protéicas.<sup>35</sup> Reações adversas para proteína de ovinos são relatadas por 50% dos alérgicos a carne de vaca quando ingerem carne de carneiro.<sup>33, 37</sup> Além disso, vários autores frequentemente mencionam que a alergia a carne bovina raramente ocorre na infância, embora reações imunes adversas e alérgenos bovinos estejam correlacionadas a alguns casos de dermatite atópica em crianças; sua incidência aparece em 0,3 % da população geral.<sup>33, 37, 38, 39, 40</sup> Assim, a análise em SDS-PAGE confirma que aparentemente a carne bovina é suscetível ao tratamento térmico com aplicação de calor, o que possibilita diminuição do seu potencial alergênico.

Para as amostras de leite, nota-se uma maior resistência tanto ao processamento térmico baseado em elevadas temperaturas quanto ao de baixas temperaturas, quando comparadas às demais fontes protéicas. Várias publicações investigam os epitopos conformacionais e lineares que constituem a  $\beta$  lactoglobulina e alegam que provavelmente sua estrutura terciária possui extrema relevância na imunoreatividade da forma nativa desta fração protéica.<sup>18, 36, 41</sup>

Host e Samuelson<sup>42</sup> investigaram o potencial alergênico do leite *in natura* em crianças, do leite pasteurizado a 75 °C por 15 segundos e do pasteurizado e homogeneizado a 60 °C (175 kg/cm<sup>2</sup>). Todas elas apresentaram positividade para TP e

DCCP com uma elevada tendência a alergenicidade, mesmo para as amostras processadas termicamente.

Os resultados encontrados neste experimento vêm ao encontro dos dados epidemiológicos da alergia alimentar na população mundial, uma vez que a alergia ao leite de vaca se destaca com maior incidência e a carne de vaca numa reduzida parcela da população.<sup>17, 35, 36</sup>

## **CONCLUSÃO**

Verifica-se que o tratamento térmico é eficiente como agente desnaturante, pois proporciona a clivagem das proteínas de fontes alimentares e pode, muitas vezes, reduzir o potencial alergênico das mesmas. Mas, que também existem algumas proteínas mais resistentes que outras no que se refere à desnaturação. Dentre elas, as proteínas do leite de vaca destacaram-se por apresentarem menor suscetibilidade ao processamento térmico. Com relação à carne de rã, apesar de ter-se mostrado em uma posição intermediária ao leite e à carne bovina, no que se refere a termo-resistência de suas proteínas constituintes, a literatura ainda é controversa com relação à segurança no consumo deste alimento por pacientes alérgicos. A carne bovina apresentou-se como fonte protéica com maior sensibilidade aos diferentes tratamentos térmicos aplicados, portanto aparentemente com baixa alergenicidade.

O uso de carnes alternativas, para indivíduos geneticamente predispostos, precisa de cuidado e avaliação individual considerando-se que nenhuma carne ou leite pode ser considerado hipoalergênico, e que a reatividade cruzada entre fontes protéicas propõe um sério problema nutricional para crianças com alergia a alimentos e em particular nas polialergênicas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Ordóñez, JA. Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: ArtMed; 2005.
2. Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. Stability of food allergens to digestion in vitro. Nat. Biotechnol. 1996; 14: 1269-1273.

3. Davis PJ, Smales CM, James DC. How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? *Allergy* 2001; 56 (67): 56-60.
4. Untersmayr E, Poulsen LK, Platzer MH, Pedersen MH, Boltz-Nitulescu G, Skov PS, Jensen-Jarolim E. The effects of gastric digestion on codfish allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115 (2): 377-382.
5. Battaisa F, Courcouxb F, Popineaua Y, Kannyc G, Moneret-Vautrinc DA, Denery-Papinia S. Food allergy to wheat: differences in immunoglobulin E-binding proteins as a function of age or symptoms. *J. Cereal Sc.* 2005; 42 (1): 109-117.
6. Miyake Y, Sasaki S, Ohya Y, Miyamoto S, Matsunaga I, Yoshida T, Hirota Y, Oda H. Soy, isoflavones and prevalence of allergic rhinitis in japanese women: The Osaka Maternal and Child Health Study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115 (6): 1176-1183.
7. Host A, Halken S, Jacobsen HP, Christensen AE, Herskind AM, Plesner K. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2002; 13 (15): 23-28.
8. Restani P, Ballabio C, Cattaneo A, Isoardi P, Terracciano L, Fiocchi A. Characterization of bovine serum albumin epitopes and their role in allergic reactions. *Allergy* 2004; 59 (78): 21-24.
9. Brenna O, Pompei C, Ortolani C, Pravettoni V, Farioli L, Pastorello E. Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 493-497.
10. Fiocchi A, Restani P, Riva E. Beef allergy in children. *Nutrition* 2000; 16: 454-457.
11. Nowak-Wegrzyn A. Future approaches to food allergy. *Pediatrics* 2003; 111 (06): 1672-1680.

12. Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115: 3-12.
13. Tattini VJ, Parra DF, Pitombo RNM. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 2006; 42 (1): 127-136.
14. Chen T, Oakley DM. Thermal analysis of proteins of pharmaceutical interest. *Thermochim. Acta* 1995; 248: 229-244.
15. Sabrá A, Del Castilho R, Sabrá S, Madi K. Tratamento da Alergia Alimentar. *In: Sabrá A, Del Castilho R, Sabrá S, Madi K. Temas de Pediatria.* Nestlé, 1995. p. 46-51.
16. Martins ER. Alergia Alimentar. *In: Rios JBM e Carvalho LP. Alergia Clínica - Diagnóstico e Tratamento.* São Paulo: Revinter; 1995. p. 505-423.
17. Szabó I, Eigenmann PA. Allergenicity of major cow's milk and peanut proteins determined by IgE and IgG immunoblotting. *Allergy* 2000; 55: 42-49.
- 18- Daher S, Tahan S, Sole D, Naspitz CK, Fagundes-Neto U, Morais, MB. Cow's milk protein intolerance and chronic constipation in children. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2001; 12: 339-342.
- 19 - Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, Washington, 1995.
20. Hsu HW, Vavak DL, Saterlee LD, Miller GA. Multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.* 1977; 42 (5): 1262-1273.
- 21 - Pires CV, Oliveira MGA, Rosa JC, Cruz GADR, Mendes FQ, Costa NMB. Digestibilidade *in vitro* e *in vivo* de proteínas de alimentos: estudo comparativo. *Alim. Nutr.* 2006; 1: 1-9.

22. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
23. Bannon G, Fu T, Kimber I, Hinton DM. Protein digestibility and relevance to allergenicity. *Health Perspect.* 2003; 111 (8): 1122-1124.
24. Sathe SK, Teuber SS, Roux KH. Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechn. Advances* 2005; 23: 423-429.
25. Besler M, Steinhart H, Paschke A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J. Chromatogr.* 2001; 756: 207-228.
26. Nunes C, Baptista AO. Implicações da reacção de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos. *Rev. Port. Ciên. Vet.* 2001; 96 (538): 53-59.
27. Cruz GADR, Oliveira MGA, Pires CV, Gomes MRA, Costa NMB, Moreira MA. Protein quality and *in vivo* digestibility of different varieties of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Brazilian J. Food Technol.* 2003; 6 (2): 157-162.
28. Restani P, Restelli AR, Capuano A, Galli CL. Digestibility of technologically treated lamb meat samples evaluated by an *in vitro* multienzymatic method. *J. Agr. Food. Chem.* 1992; 40: 989-993.
29. Roy I, Gupta MN. Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2004; 39: 165-177.
30. Hilger C, Grigioni F, Thill L, Mertens L, Hentges F. Severe IgE-mediated anaphylaxis following consumption of fried frog legs: definition of  $\alpha$  parvalbumin as the allergen in cause. *Allergy* 2002; 57: 1053-1058.

31. Hilger C, Thill L, Grigioni F, Lehnert C, Falagiani P, Ferrara A, Romano C, Stevens W, Hentges F. IgE antibodies of fish allergic patients cross-react with frog parvalbumin. *Allergy* 2004; 59: 653-660.
32. Bernhisel-Broadbent J, Strause D, Sampson HA. Fish hypersensitivity: clinical prevalence of altered fish allergenicity caused by various preparation methods. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992; 90: 622-629.
33. Sampson HA. Update of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 113: 805-819.
34. Beretta B, Conti A, Fiocchi A. Antigenic determinants of bovine serum albumin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2001; 126: 188-195.
35. Sampson HA. The role of food allergy and mediator release in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988; 81: 635-639.
36. Werfel S, Cooke SK, Sampson JA. Clinical reactivity to beef in children allergic to cow's milk. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997; 99: 287-293.
37. Fiocchi A.; Restani P.; Riva E. Meat allergy II - Effects of food processing and enzymatic digestion on the allergenicity of bovine and ovine meats. *J. Am. Coll. Nutrition* 1995; 14: 245-250.
38. Rancé F, Kanny G, Dutau G, Moneret-Valtrin DA. Food hypersensitivity in children: Clinical aspects and distribution of allergens. *Pediatr. Allergy Immunol.* 1990; 10: 33-38.
39. Sampson, HA. Food allergy: when mucosal immunity goes wrong. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115: 139-141.

40 - Fiocchi A, Restani P, Riva E. Heat treatment modifies the allergenicity of beef and bovine serum albumin. *Allergy* 1998; 53: 798-802.

41. Maier I, Okuna VM, Pittner F, Lindner W. Changes in peptic digestibility of bovine  $\beta$ -lactoglobulin as a result of food processing studied by capillary electrophoresis and immunochemical methods. *J. Chromatogr.* 2006; 841: 160-167.

42. Host A, Samuelsson EG. Allergic reactions to raw, pasteurized and homogenized/pasteurized cow milk: a comparison. *Allergy* 1988; 43: 113-117.

**CAPÍTULO 3**  
**ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO INTESTINO DELGADO DE**  
**CAMUNDONGOS BALB/c EM MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO**  
**DA ALERGIA ALIMENTAR**

**RESUMO**

Embora vários modelos para estudo da alergia alimentar *in vivo* já tenham sido descritos, nenhum deles utiliza o alérgeno na dieta dos animais. Este trabalho descreve a comparação entre dois modelos experimentais de alergia alimentar desenvolvidos em camundongos BALB/c, nas quais as administrações do alérgeno foram realizadas por meio da dieta ou por via intragástrica. O experimento teve duração de 28 dias e os animais foram sensibilizados por meio de injeção subcutânea no 1º e 14º dias com extrato de leite *in natura*, extrato de carne bovina ou extrato da carne de rã. O modelo experimental que recebeu o alérgeno na forma intacta apresentou alterações morfológicas mais evidentes quando comparado ao que recebeu o alérgeno tratado termicamente. Evidenciou-se também a existência de algumas proteínas mais resistentes que outras no que se refere à desnaturação, uma vez que quando comparados os resultados nos dois modelos, as diferenças foram mais proeminentes para os alérgenos leite e rã. Estes resultados reforçam os dados epidemiológicos de incidência de alergia na população mundial.

**Palavras-chave:** morfometria, intestino delgado, alergia alimentar, modelo animal.



## ABSTRACT

Although some models for *in vivo* food allergy studies have already been described, none of them uses allergen in animals' diet. This work describes the comparison between two developed experimental food allergy models in BALB/c mice, in which the allergen administration was carried either through diet or intragastric way. The experiment last for 28 days and the animals were sensitized by means of subcutaneous injection in the 1<sup>st</sup> and 14<sup>th</sup> days with milk extract, raw bovine meat extract or frog meat extract. The experimental model that received the allergen in the intact form presented morfometric evidences alterations when compared with the one that received the thermally treated allergen. The existence of some more resistant proteins than others was also proven related to the denaturation, once compared the results of the two models, the differences were more prominent for the milk and frog allergens. These results strengthen the allergy incidence epidemiologic data in the world's population.

**Keywords:** morfometry, small intestine, food allergy, animal model

## INTRODUÇÃO

A alergia é essencialmente uma doença inflamatória e as manifestações clínicas mais comuns ligadas à alergia alimentar são as cutâneas, principalmente eczema atópico, e as gastrintestinais mediadas ou não por IgE.<sup>1</sup>

A alergia alimentar é caracterizada por uma resposta do sistema imunológico, presente principalmente na mucosa gastrintestinal, a antígenos ingeridos por via oral. A maior parte dos alérgenos alimentares são proteínas de baixo peso molecular, entre 10 e 70 kDa, sendo ainda em sua maioria hidrossolúveis e termo-resistentes.<sup>2</sup>

Ao mesmo tempo em que os enterócitos são responsáveis pela absorção de nutrientes, é na mucosa do intestino delgado que ocorre a maior parte do contato com materiais antigênicos no trato gastrintestinal.<sup>3</sup>

Vários mecanismos de defesa conferem à mucosa gastrintestinal uma estrutura complexa que funciona utilizando fatores fisiológicos e celulares para impedir a penetração de antígenos. Sua barreira física é composta pelos enterócitos unidos por complexo juncional constituído de junções oclusivas, de adesão e comunicantes. A superfície dos enterócitos é recoberta por muco, secretado pelas células caliciformes, que consiste basicamente de mucinas com uma grande quantidade de glicoproteínas.<sup>4</sup> As células de Paneth também desempenham importante papel na defesa contra microorganismos e alérgenos, pois produzem polipeptídeos tais como lisozimas e fatores de crescimento, secretados no lúmen, que ajudam no processo de proteção da mucosa.<sup>5</sup> Como conseqüência da constante e grande quantidade de fatores de excitação antigênica, a mucosa de intestino possui o maior complexo linfóide do corpo e grande proporção de linfócitos ativados.<sup>6</sup> Os linfócitos são as únicas células do corpo capazes de reconhecer e distinguir de modo específico diversos determinantes antigênicos e são responsáveis por duas características importantes da resposta imunológica adquirida: especificidade e memória.<sup>6,7</sup>

Além do linfócito T, outras duas células parecem desempenhar importante papel durante a inflamação alérgica de origem alimentar: são elas o eosinófilo e o mastócito. Eosinófilos e mastócitos são as principais células efetoras da resposta imunológica no intestino delgado, considerando a célula Th2 como coordenadora do processo. A principal conseqüência da ativação do mastócito é a liberação de histamina e de outros mediadores responsáveis pelo quadro agudo da reação alérgica. A ativação dos

eosinófilos estimula a liberação extracelular das proteínas catiônicas (ECP) com potente ação citotóxica, acreditando-se que representem importante papel no desenvolvimento de sintomas subagudos e crônicos da alergia.<sup>8</sup>

Em consequência da intensa atividade entérica, existe um processo dinâmico de proliferação, diferenciação e morte celular no intestino delgado. Nas criptas, ocorre proliferação celular e migração em direção ao topo das vilosidades.<sup>4</sup>

Vários autores têm relatado que além de um maior recrutamento de células imunológicas ativadas, uma sensibilização alérgica precoce pode acarretar alterações na morfologia intestinal.<sup>7,9,10</sup>

Alguns estudos desenvolvidos em suínos têm mostrado correlação entre possível sensibilização e alterações na morfologia intestinal.<sup>3,11</sup> Geralmente os estudos têm o foco em diferentes fontes protéicas administradas aos animais logo após o desmame.<sup>3</sup> Assim, a análise de parâmetros morfométricos da mucosa intestinal pode revelar situações de injúria e de inflamação local por meio da modificação da conformação histológica destas áreas.

Objetivou-se neste estudo realizar a análise morfométrica do intestino delgado de camundongos BALB/c sensibilizados por via subcutânea, e que posteriormente receberam o alérgeno, tratado termicamente, por meio da dieta ou por meio de gavagem, em sua forma íntegra.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Animais***

Foram utilizados 48 camundongos BALB/c de ambos os sexos, com 7 semanas de idade e peso médio de  $20 \pm 1,48$ g, oriundos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e de Saúde da UFV.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais. O primeiro grupo (Tabela 1) foi composto por quatro subgrupos: um controle (CD), com animais não sensibilizados que receberam dieta semi-purificada padrão para roedores (AIN-93G)<sup>12</sup> e três subgrupos denominados “controles positivos” com animais sensibilizados com proteínas do leite (LTT), carne de rã (RTT) e bovina (BTT) *in natura*, que receberam dietas AIN-93 modificadas em sua composição protéica de acordo com a sensibilização. O segundo grupo (Tabela 2) também foi composto por quatro subgrupos: um controle

(CG), com animais não sensibilizados que receberam dieta AIN-93G e gavagem com água destilada e três outros subgrupos denominados “controles positivos” com animais sensibilizados com extrato de leite (GGL), de carne de rã (GGR) e carne bovina (GGB) *in natura*, que receberam dieta AIN-93 e gavagem do extrato do alérgeno.

Tabela 1 – Grupo 1, com respectivos subgrupos que receberam diferentes fontes protéicas, tratadas termicamente, na dieta.

<i>Subgrupos</i>	<i>N</i>	<i>Dietas</i>
CD	6	AIN-93G
LTT	6	Caseína da dieta AIN-93 G substituída por leite
RTT	6	Caseína da dieta AIN-93 G substituída por carne de rã
BTT	6	Caseína da dieta AIN-93 G substituída por carne de boi

Tabela 2 – Grupo 2, com respectivos subgrupos que receberam dieta AIN-93 G e gavagem com extrato *in natura* do alérgeno.

<i>Subgrupos</i>	<i>N</i>	<i>Dieta</i>	<i>Gavagem</i>
CG	6	AIN-93G	Água destilada
GGL	6	AIN-93G	Extrato de leite de vaca
GGR	6	AIN-93G	Extrato de carne de rã
GGB	6	AIN-93G	Extrato de carne de boi

Durante o experimento os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, separados de acordo com a dieta e sexo, em ambiente com temperatura controlada (22°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo alimentação e água *ad libitum*.

### ***Preparo das dietas***

As dietas foram preparadas, com base na dieta AIN-93G<sup>12</sup> com modificação no tipo de proteína oferecida, conforme a sensibilização do grupo (Tabela 3). O leite em pó desnatado e a carne bovina foram adquiridos no comércio local, enquanto a carne de rã foi proveniente do Ranário da Universidade Federal de Viçosa.

As amostras cárneas, tanto bovina quanto de rã, foram processadas de forma a simular o tratamento térmico doméstico (TT), no Laboratório de Estudo Experimental

dos Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde. Aplicou-se calor seco, sob temperatura de 95°C durante 15 minutos, e posteriormente desidratação em estufa com circulação de ar a 65 °C durante 4 horas. Para o leite não foram utilizados tratamentos térmicos adicionais ao processamento industrial.

Todos os ingredientes foram pesados em balança semi-analítica. As dietas foram preparadas semanalmente, identificadas e estocadas a 4°C até o momento de distribuição.

Tabela 3 – Composição das dietas experimentais.

Ingredientes	Grupos com alérgeno na dieta				Grupos com alérgeno na gavagem			
	CD	LTT	RTT	BTT	CG	GGL	GGR	GGT
	g/kg dieta							
Caseína	123,7	–	–	–	123,7	123,7	123,7	123,7
Leite vaca pó (desnatado)	–	301,9	–	–	–	–	–	–
Rã cozida e desidratada	–	–	114,52	–	–	–	–	–
Boi cozido e desidratada	–	–	–	113,3	–	–	–	–
Amido dextrinizado	132	132	132	132	132	132	132	132
Sacarose	100	100	100	100	100	100	100	100
Óleo de soja	70	68,19	67,35	66,22	70	70	70	70
Celulose	50	50	50	50	50	50	50	50
Mistura de minerais	35	35	35	35	35	35	35	35
Mistura de vitaminas	10	10	10	10	10	10	10	10
L Cistina	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Bitartarato colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Amido de milho	473,8	297,4	485,6	487,9	473,8	473,8	473,8	473,8

### ***Protocolo de sensibilização***

O experimento teve a duração de 28 dias, a contar do primeiro dia (D1). A sensibilização ocorreu por meio de injeção subcutânea de 1 mg do alérgeno, na forma de extrato, com 1 mg de Al(OH)<sub>3</sub> como adjuvante. A sensibilização ocorreu em dois momentos: D1 e D14, com a utilização do mesmo protocolo.

### ***Preparo do extrato para sensibilização e gavagem***

Para o preparo do extrato dos produtos cárneos foram utilizados 100 g de carne de boi e 100 g de carne de rã. Primeiramente realizou-se trituração mecânica por meio de multiprocessador de alimentos. Em seguida, a carne já triturada foi adicionada de 50 mL de água destilada e macerada manualmente por mais 1 minuto. O produto da maceração foi coado duas vezes, em gaze esterilizada, para eliminação dos resíduos sólidos. A quantidade de proteína do extrato resultante foi analisada e adequada, por meio de diluição, para atender a especificação protéica para sensibilização e gavagem.

Cada animal recebeu durante o experimento duas doses de 0,5 mL do extrato contendo 1 mg da proteína alérgica, por meio de gavagem, de acordo com a dieta e com a sensibilização recebida. As doses foram administradas no 8º e 16º dia do experimento.

### ***Coleta do material***

No 28º dia os animais foram eutanasiados e amostras sanguíneas foram coletadas da aorta abdominal sendo armazenadas para realização de leucograma. Fragmentos das 3 secções do intestino delgado foram coletados e fixados em formol tamponado, por 24 horas, e processados histologicamente para análise morfométrica.

As preparações histológicas foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural, do Departamento de Biologia Geral (UFV). Duodeno, jejuno e íleo, após desidratação em série etanólica e inclusão em resina (Historesin<sup>®</sup> - Leica), foram seccionados em micrótomo rotativo (RM 2155 - Leica), transversal e longitudinalmente, na espessura de 2µm e corados com hematoxilina e eosina.

Após obtenção das imagens em fotomicroscópio (AX-70 Olympus), os preparados histológicos foram submetidos à análise morfométrica com a ajuda de um software de análise de imagens (Image Pro Plus 4.0 - Media Cybernetics<sup>®</sup>). Com relação à morfometria, foram mensuradas a altura da vilosidade (AV), a profundidade cripta (PC), largura da vilosidade (LV), altura do epitélio (AE), espessura da muscular da mucosa (MM), espessura da muscular circular interna (MI) e espessura da muscular longitudinal externa (ME). Os parâmetros morfométricos analisados estão identificados na Figura 1. Os valores mensurados para os parâmetros morfométricos encontram-se nos Apêndices 1 e 2.

Realizou-se posteriormente a contagem de eosinófilos nas preparações histológicas, em três áreas distintas para cada secção intestinal, perfazendo um total de 5,7 mm<sup>2</sup> avaliado por segmento do intestino delgado de cada animal.

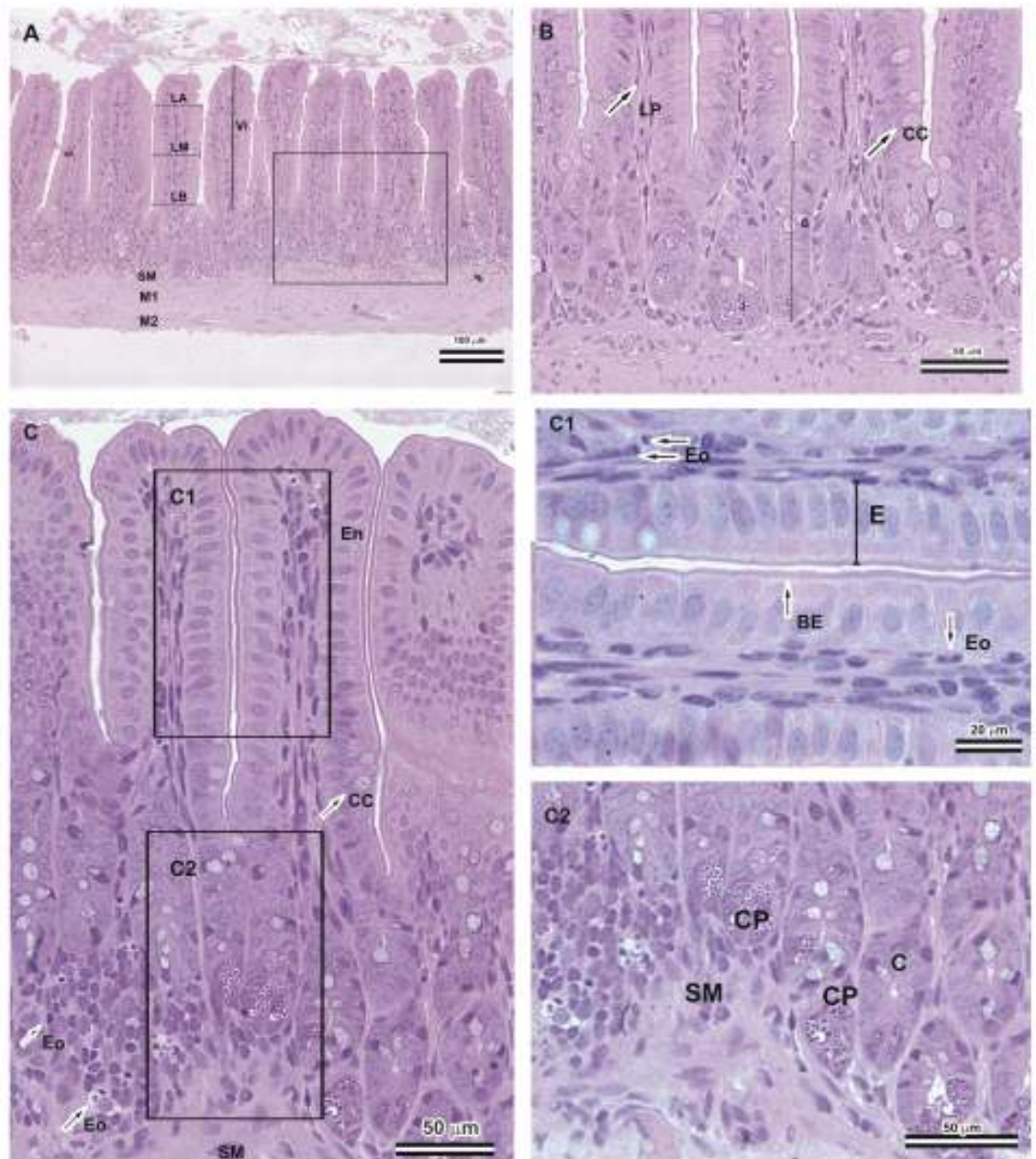


Figura 1 – **A**: largura do ápice (LA), largura média (LM), largura da base (LB), altura da vilosidade (Vi), submucosa (Sb), túnica muscular (M1, M2); **B**: lâmina própria (LP), célula caliciforme (CC), cripta (C); **C**: eosinófilo (Eo), submucosa (Sb), célula caliciforme (CC); **C1**: borda estriada (BE), altura do epitélio (AE), eosinófilo (Eo); **C2**: célula de Paneth (CP), submucosa (Sb), cripta (C).

## ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se o software Statistics por análise de variância, com a utilização do teste de médias Duncan ou teste *t* Student, quando apropriado, com nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao consumo alimentar, não foi verificada diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos que compunham o modelo experimental no qual os camundongos receberam o alérgeno via dieta. Evidencia-se, porém, queda no consumo alimentar (Figura 2) nos dias que se seguiram à sensibilização dos animais, o que era de se esperar uma vez que resposta imunológica se formava localmente e poderia diminuir o apetite dos animais.

Poucos trabalhos discutem o consumo alimentar uma vez que o alérgeno é frequentemente veiculado na água de consumo dos animais e não na dieta. Nestes casos, o relato é de perda de peso em consequência de desidratação, confirmando então um menor consumo do material que é vinculado ao alérgeno, seja alimento ou bebida.<sup>13</sup>

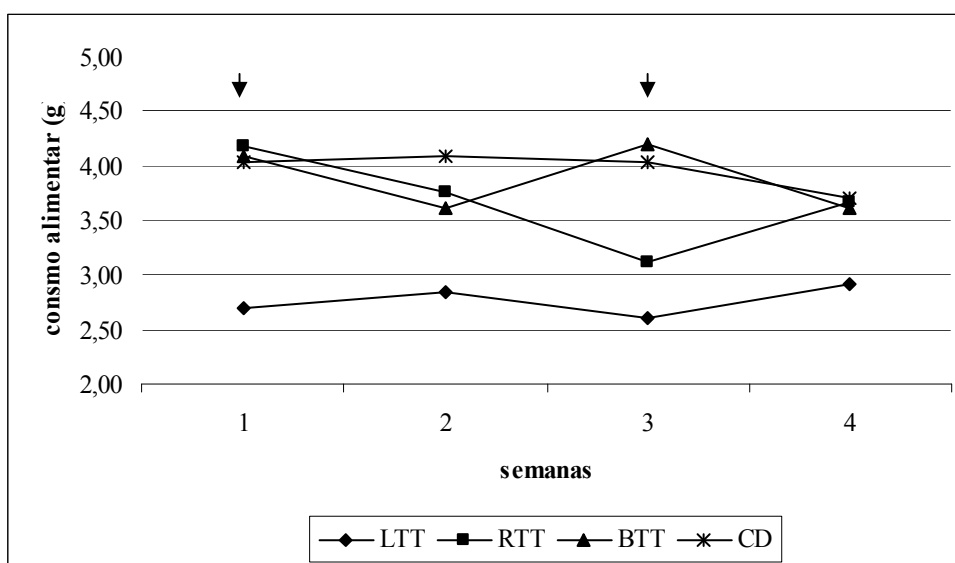


Figura 2 – Consumo semanal *per capita* dos animais que receberam diferentes fontes protéicas tratadas termicamente.

Os animais que receberam gavagem com o extrato do alérgeno *in natura* apresentaram queda mais acentuada no consumo alimentar (Figura 3) após a primeira sensibilização quando comparado à segunda sensibilização. Observou-se diferença



estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo CG e os demais grupos e entre os animais do grupo GGL e GGB, entre o grupo GGR e GGB.

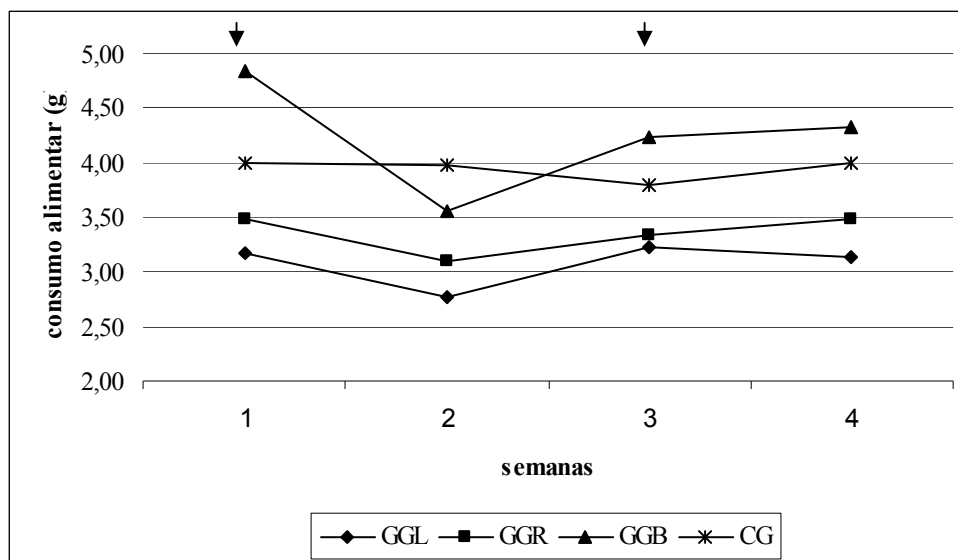


Figura 3 – Consumo semanal *per capita* dos animais que receberam diferentes fontes protéicas com o alérgeno por meio de gavagem.

Uma possível justificativa para as diferenças encontradas nos dados de consumo alimentar dos grupos GGL e GGB, poderia ser a probabilidade de maior alergenicidade do leite em relação à carne bovina, uma vez que a gavagem continha estes alérgenos.<sup>14,15</sup>

Outro ponto que merece destaque é o fato de que no extrato administrado por meio de gavagem as proteínas se encontravam em sua forma intacta, estado que confere maior poder alergênico às frações protéicas.<sup>16</sup> Host e Samuelson<sup>17</sup> investigaram o potencial alergênico do leite *in natura*, do leite pasteurizado a 75 °C por 15 segundos e do pasteurizado e homogeneizado a 60 °C (175Kg/cm<sup>2</sup>) em crianças. Todas elas apresentaram positividade para teste de puntura (TP) e para o desencadeamento cego controlado por placebo (DCCP), com elevada tendência a alergenicidade, inclusive para as amostras processadas. Sampson e MacCaskill<sup>18</sup> encontraram positividade no TP para carne de boi em 15,9% em indivíduos reconhecidamente atópicos, embora após o DCCP somente 1,8% tenham sido confirmados como alérgicos à carne de boi.

Com relação ao peso, não houve diferença entre os grupos que receberam o alérgeno por meio da dieta (Figura 4) apesar dos diferentes valores para ganho e perda de peso encontrados durante o experimento.

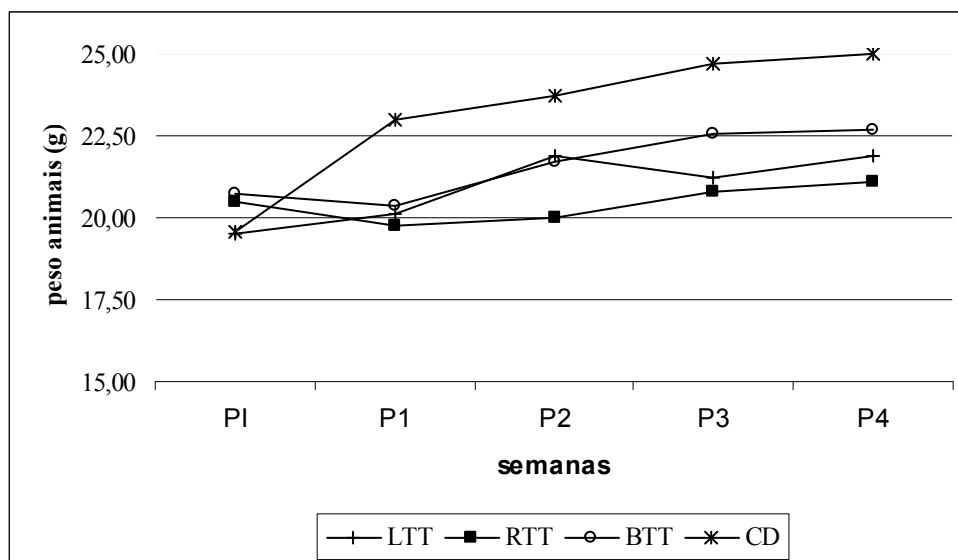


Figura 4 – Valores médios para variações de peso, durante o experimento, para os animais que receberam o alérgeno tratado termicamente por meio da dieta.

Obs.: considerar peso inicial (PI), peso ao final da primeira semana (P1), peso ao final da segunda semana (P2), peso ao final da terceira semana (P3) e peso ao final da quarta semana (P4).

O peso dos animais dos grupos nos quais foi administrado o alérgeno por meio de gavagem (Figura 5) não apresentou diferença estatisticamente significativa.

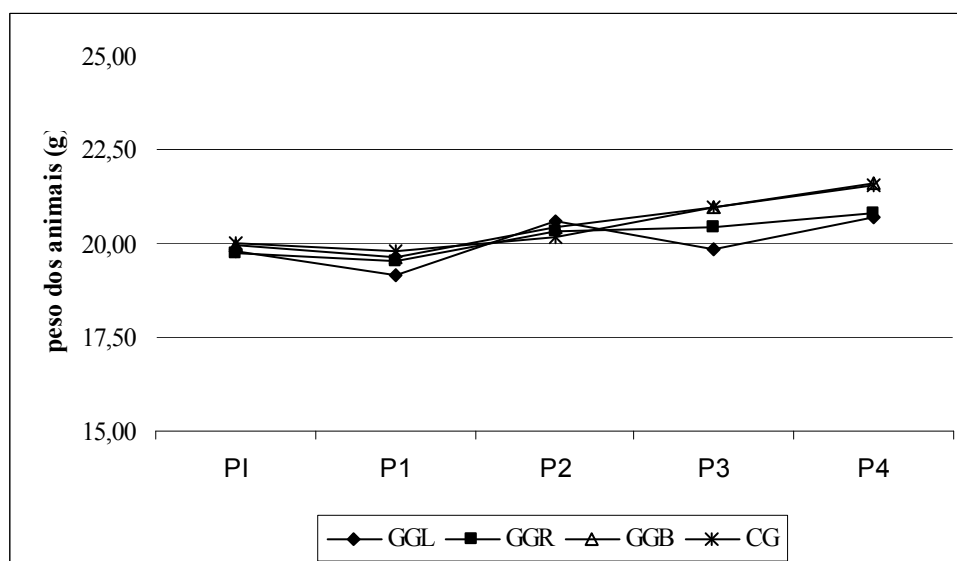


Figura 5 – Valores médios para variações de peso, durante o experimento, para os animais que receberam o extrato do alérgeno por meio de gavagem.

Para avaliar a ação das diferentes alérgenos e formas de administração, realizou-se contagem global de leucócitos e contagem diferencial. A contagem global não apresentou resultados significativos ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos e todos se encontravam dentro da variação normal para a espécie.

Encontraram-se, para eosinófilos, os seguintes valores: 0,07; 0,06; 0,05 e 0,02 x  $10^3$  células/ $\mu\text{l}$ , respectivamente para LTT, RTT, BTT e CD. Para os animais que receberam gavagem, os valores foram 0,21; 0,06; 0,07 e 0,01 x  $10^3$  células/ $\mu\text{l}$  para GGL, GGR, GGB e CG, respectivamente. Os valores normais variam de 0,0 a 0,38 x  $10^3$  células/ $\mu\text{l}$  e, portanto, apesar das diferenças, os valores apresentaram-se dentro do padrão de normalidade.<sup>19</sup>

Na contagem de eosinófilos no intestino delgado, os animais do grupo 1 apresentaram em média  $18 \pm 9,28$ ;  $18 \pm 11,06$ ;  $16 \pm 9,26$  e  $11 \pm 3,81$  para os grupos LTT, RTT, BTT e CD, respectivamente. Já a contagem realizada nas preparações histológicas dos animais do grupo 2, encontrou-se em média  $28 \pm 16,88$ ;  $20 \pm 7,54$ ;  $13 \pm 8,92$  e  $15 \pm 7,6$  eosinófilos para os grupos GGL, GGR, GGB e CG, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos resultados apresentados acima.

Análise realizada por meio de retossigmoidoscopia, em indivíduos alérgicos ao leite de vaca, evidencia mucosa edemaciada e hiperêmica<sup>20</sup> embora a microscopia usualmente mostre a arquitetura das criptas e dos enterócitos preservadas, mas com forte eosinofilia e presença de macrófagos, neutrófilos e linfócitos intra-epiteliais.<sup>21</sup>

Eosinófilos são normalmente encontrados por todo o trato gastrintestinal (GI), exceto no esôfago de pacientes jovens. No caso das análises de biópsias do trato GI deve-se levar em consideração se o número de eosinófilos é significantemente maior do que a densidade normal para um determinado local anatômico. Critérios para eosinofilia do trato GI variam, mas de maneira geral a presença de eosinófilos no esôfago de indivíduos jovens é considerada anormal. O estômago de crianças geralmente apresenta densidade baixa de eosinófilos na mucosa, com concentrações maiores no intestino delgado. Algumas patologias podem gerar significativo recrutamento de eosinófilos no trato GI e são chamadas de desordens gastrintestinais eosinofílicas, sendo definidas como desordens que afetam primeiramente o trato GI com inflamações ricas em eosinófilos na ausência de causas conhecidas para a eosinofilia. Pelo menos um

subconjunto dos pacientes que apresentam este tipo de patologia aparentam ter doenças alérgicas, com características intermediárias entre alergia alimentar mediada por IgE e hipersensibilidade mediada por células.<sup>22</sup>

Existem modelos animais para a gastrenterite eosinofílica, mas estes por sua vez indicam que associada à eosinofilia coexiste um aumento nos marcadores para mastócitos, indicando uma associação destes dois tipos celulares na patofisiologia da gastrenterite eosinofílica.<sup>23, 24</sup> Em alguns desses modelos, principalmente nos desenvolvidos com camundongos, a liberação de interleucina 5 (IL5) é apontada como a chave reguladora do acúmulo eosinofílico no trato GI.<sup>21</sup> De maneira interessante, também há relatos de esofagite eosinofílica em modelos de alergia onde a administração de antígeno acontece por via intranasal.<sup>25</sup>

Quando comparadas, as variáveis morfométricas analisadas por tipo de alérgeno nos diferentes segmentos do intestino delgado, para os animais que receberam o alérgeno via dieta, encontrou-se no duodeno diferença significativa entre alturas de vilosidades (AV) dos animais (Figura 6) do grupo LTT com os animais dos grupos BTT e CD. Encontrou-se também diferença ( $p < 0,05$ ) entre o grupo RTT com os grupos BTT e CD. Adicionalmente, houve no jejuno diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para os valores de AV entre o grupo LTT e o CD. Tais achados corroboram os dados divulgados por Scandolera *et al.*<sup>3</sup>, que compararam diferentes fontes protéicas usadas na ração de suínos por ocasião do desmame. Para todos os tratamentos encontraram efeito deletério similar sobre a morfologia da mucosa intestinal e nenhuma das fontes protéicas utilizadas foi capaz de minimizar tais efeitos nos animais.

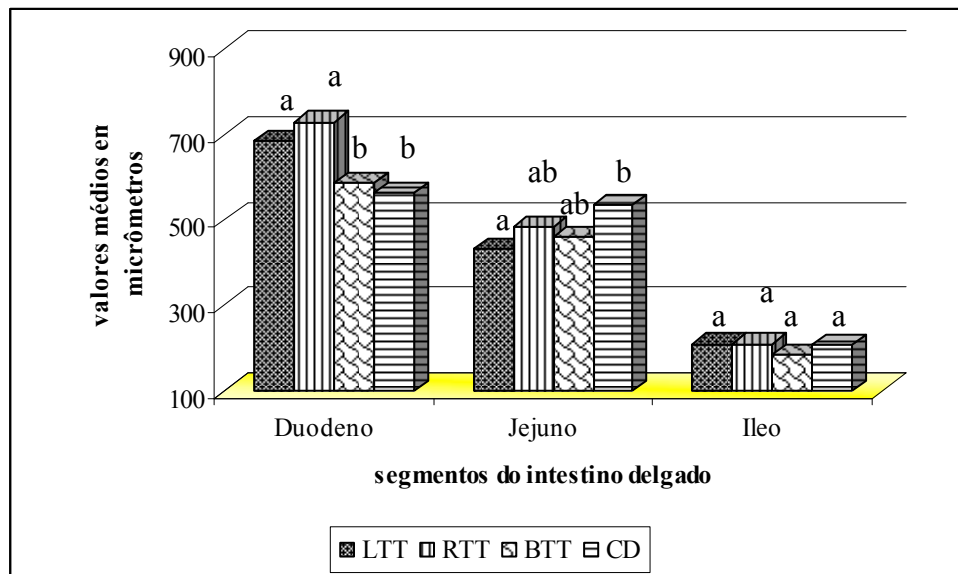


Figura 6 – Altura média das vilosidades em diferentes secções do intestino delgado dos animais do grupo 1.

Quanto aos valores para profundidade de cripta (PC), nenhuma diferença estatística foi encontrada para as mensurações no duodeno ou no íleo, em animais que receberam o alérgeno via dieta (Figura 7). No jejuno encontrou-se diferença ( $p < 0,05$ ) para PC entre os grupos LTT e BTT.

Quando ocorre renovação celular na mucosa intestinal, há uma hiperplasia nas células da cripta e deslocamento no sentido da vilosidade.<sup>26</sup> Assim esperava-se um aumento significativo da profundidade da cripta nos animais que foram sensibilizados e que consumiram a proteína láctea, pois esta contém  $\beta$  lactoglobulina, fração protéica com reconhecida alergenicidade quando comparada a outras na literatura.<sup>27</sup>

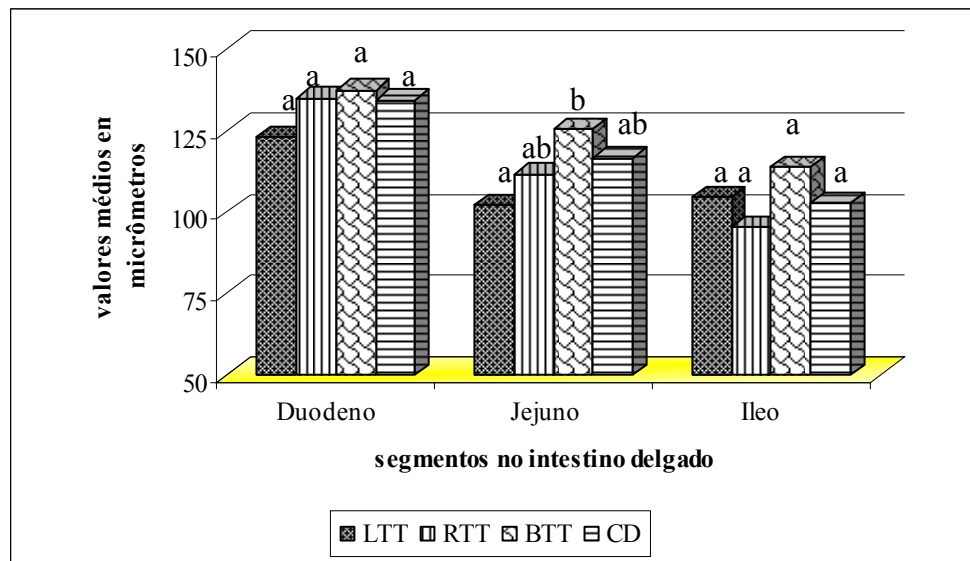


Figura 7 - Profundidade média das criptas em diferentes secções do intestino delgado dos animais do grupo 1.

Uma boa relação altura do vilos/profundidade de cripta ocorre quando os vilos se apresentam altos e as criptas pouco profundas, proporcionando melhor absorção de nutrientes.<sup>28</sup>

Considerando-se que a forma básica da vilosidade é similar a uma estrutura cônica, o aumento na sua largura pode indicar mudança de sua forma alongada para achatada.<sup>26</sup> Assim, o aumento da largura da vilosidade tendeu a acontecer os animais do grupo LTT em todos os segmentos intestinais, apesar da diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) ter sido encontrada somente entre os grupos LTT e BTT no duodeno.

Quando avaliado o parâmetro largura da vilosidade (LV) (Figura 8), encontrou-se diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no duodeno, entre os grupos LTT e BTT.

Com relação ao parâmetro altura de epitélio (AE) encontrou-se diferença estatisticamente significativa somente no jejuno, entre animais dos grupos BTT e CD.

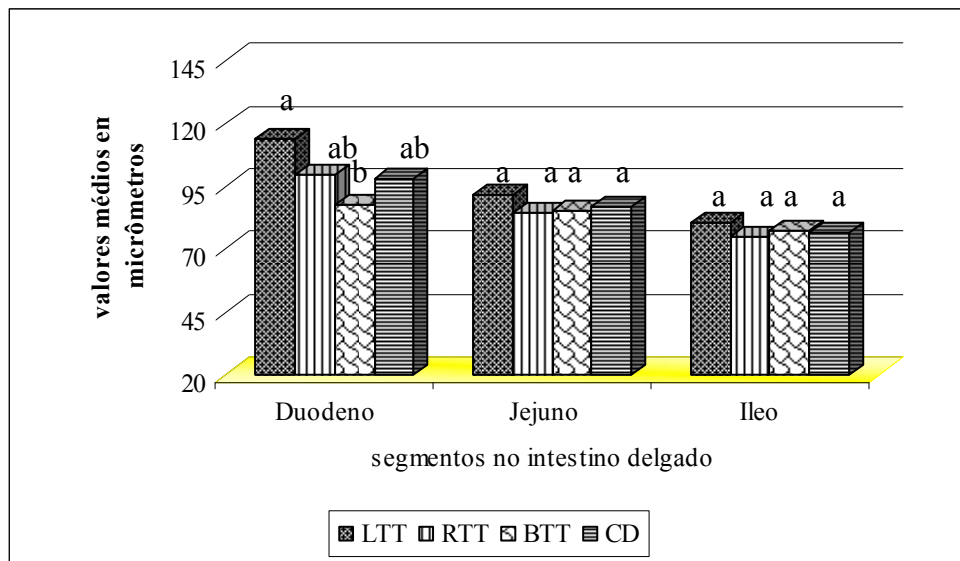


Figura 8 – Valores médios mensurados para largura da vilosidade em diferentes secções do intestino delgado dos animais do grupo 1.

Para os valores mensurados para muscular da mucosa (MM) (Figura 9) encontrou-se diferença estatística ( $p < 0,05$ ), no duodeno, entre os grupos BTT e CD. No jejuno, houve diferença estatisticamente significativa para o grupo LTT quando comparado aos grupos BTT e RTT, e nos grupos RTT e BTT quando comparados ao grupo CD. Para íleo encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos BTT e CD.

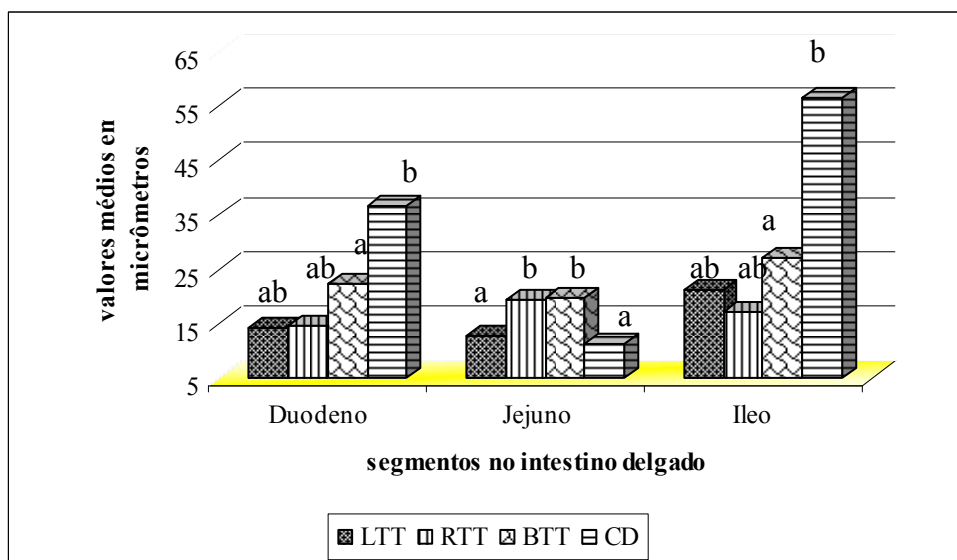


Figura 9 – Valores médios mensurados para espessura da muscular da mucosa em diferentes secções do intestino delgado dos animais do grupo 1.

Para a camada muscular interna (MI) encontrou-se diferença ( $p < 0,05$ ) nos valores mensurados no duodeno para o grupo LTT quando comparado aos grupos RTT e BTT e nos grupos BTT e RTT quando comparados ao grupo CD. No jejuno a diferença foi encontrada para o grupo LTT quando comparado aos grupos BTT e CD. No íleo não foram encontradas diferenças significativas. Com relação aos valores mensurados para a camada muscular externa (ME), não foram encontradas diferenças significativas.

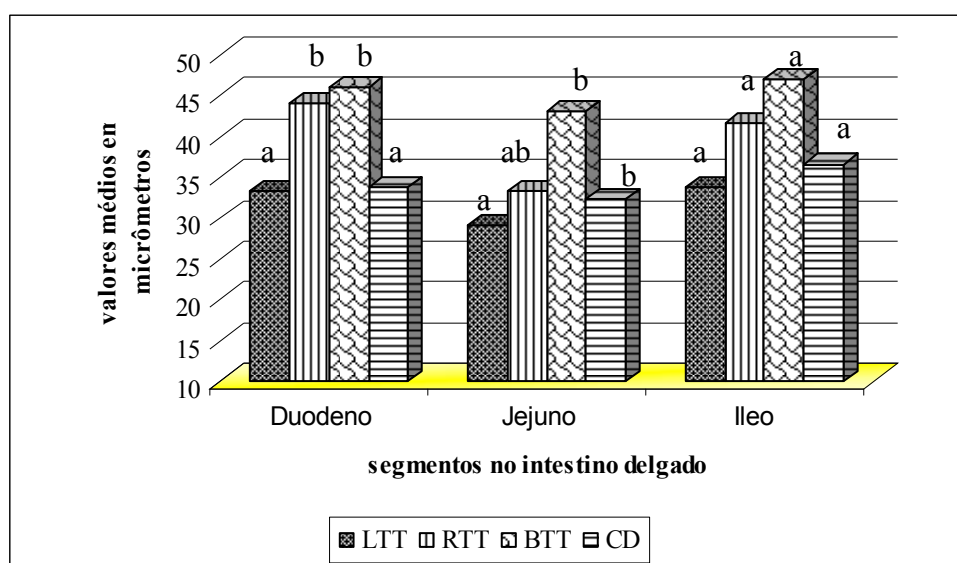


Figura 10 – Espessura da muscular circular interna em diferentes secções do intestino delgado dos animais do grupo 1.

Para o parâmetro AV (Figura 11) mensurado nos animais que receberam o alérgeno via gavagem, foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) somente no íleo, para o grupo GGR quando comparado aos grupos GGB e CG.



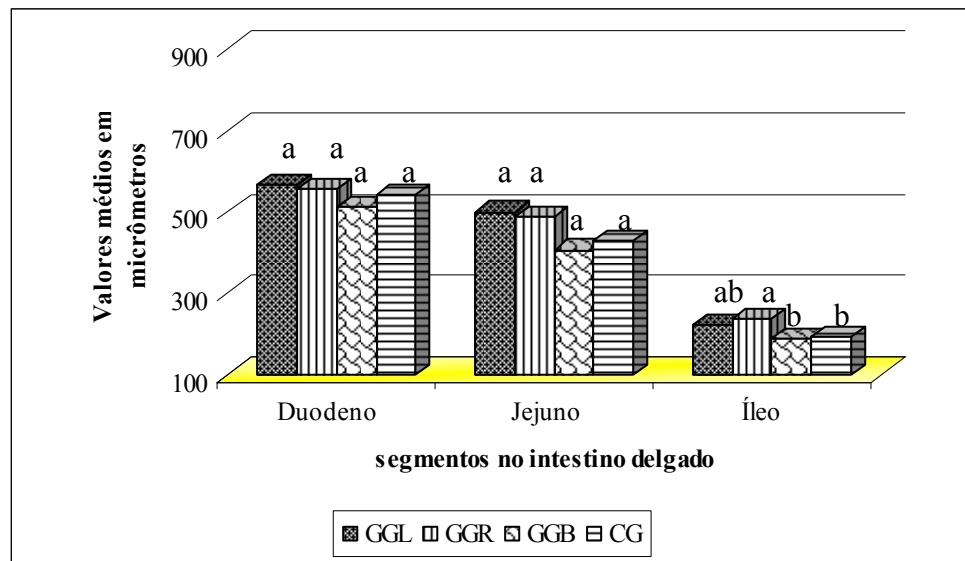


Figura 12 - Altura média das vilosidades no antestino delgado no modelo de alergia alimentar dos animais do grupo 2.

Com relação à variável PC (Figura 13), encontrou-se diferença estatística ( $p < 0,05$ ) no íleo, entre os animais dos grupos GGL e GGR e para o grupo GGR quando comparado aos grupos GGB e CG.

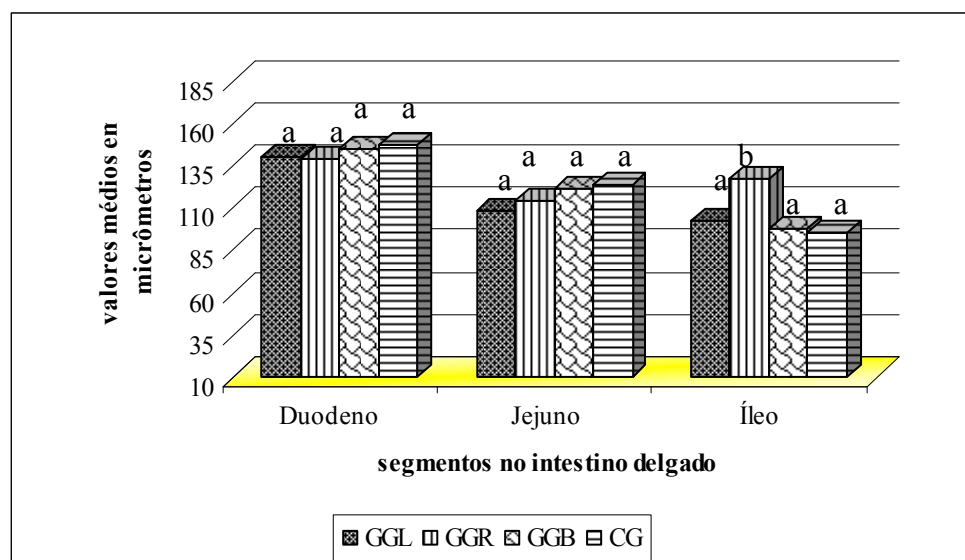


Figura 13 – Valores para profundidade das criptas no intestino delgado no modelo de alergia alimentar para os animais do grupo 2.

A profundidade das criptas está diretamente relacionada ao aumento da proliferação celular e esta, por sua vez, tende a ocorrer de forma exacerbada em períodos de inflamação ou injúria da mucosa intestinal.<sup>9</sup>

Quando os grupos foram comparados com relação à LV encontrou-se diferença somente no jejuno, entre os grupos GGR e GGB (Figura 14).

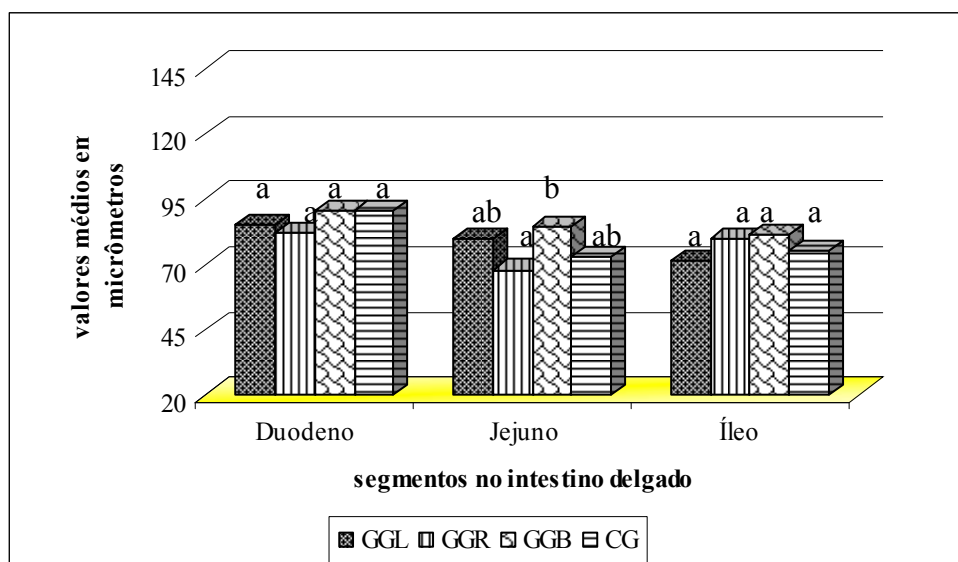


Figura 14 - Valores mensurados para largura da vilosidade no intestino delgado no modelo de alergia alimentar para os animais do grupo 2.

Para a variável MM houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre o grupo GGB e o CG. Para a variável MI, os valores mensurados no duodeno apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) quando comparados os grupos GGL e GGR, no jejuno quando comparado o grupo GGL com os grupos GGR e CG e entre GGB e CG. Encontrou-se também diferença ( $p < 0,05$ ) para os valores de ME no duodeno, entre o grupo GGL quando comparado aos grupos GGR e CG e entre o grupo GGB e o CG.

Houve também a comparação entre as variáveis morfométricas nos diferentes modelos experimentais realizados, por tipo de alérgeno nos segmentos investigados no intestino delgado.

Encontrou-se diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na altura e largura da vilosidade e na profundidade da cripta no duodeno, quando o alérgeno utilizado era o leite. Na Tabela 5 pode-se observar claramente que o grupo LTT apresentou AV 18 % maior que o grupo GGL e o valor para LV apresentou-se aproximadamente 25% maior nestes mesmos grupos, respectivamente. Por outro lado, o valor médio para PC

apresentou-se aproximadamente 12% maior em GGL que o valor mensurado em LTT. Como discutido anteriormente, tal achado pode ser consequência da presença de  $\beta$  lactoglobulina no extrato lácteo, uma fração protéica reconhecida na literatura com significativo poder antigênico, principalmente quando a mesma é administrada em sua forma nativa.<sup>29</sup>

Tabela 5 – Medidas aferidas para as variáveis mensuradas no duodeno dos animais sensibilizados com leite.

<i>Parâmetros</i>	<i>LTT</i>	<i>GGL</i>
Altura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ )	685,94 $\pm$ 66,22 <sup>a</sup>	565,83 $\pm$ 84,06 <sup>b</sup>
Largura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ )	113,94 $\pm$ 18,80 <sup>a</sup>	85,01 $\pm$ 6,63 <sup>b</sup>
Profundidade da cripta ( $\mu\text{m}$ )	122,81 $\pm$ 11,52 <sup>b</sup>	140,08 $\pm$ 16,17 <sup>a</sup>

Ainda com o leite como alérgeno, encontrou-se diferença estatisticamente significativa para a altura do epitélio no jejuno, 32,45  $\mu\text{m}$  e 26,90  $\mu\text{m}$ , para os animais que receberam a proteína da dieta tratada termicamente e gavagem respectivamente. Os resultados encontrados neste experimento reforçam os dados epidemiológicos discutidos na literatura com relação à incidência da alergia alimentar na população mundial, uma vez que a alergia ao leite de vaca apresenta maior frequência quando comparada à alergia a carne de vaca na população em geral.<sup>27, 30</sup>

Quando o alérgeno utilizado foi o extrato de rã, encontrou-se diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no duodeno para os parâmetros altura e largura da vilosidade e altura do epitélio (Tabela 6). O grupo RTT apresentou um valor para AV aproximadamente 24% maior que o apresentado pelo grupo GGR.

Tabela 6 - Medidas aferidas para as variáveis mensuradas no duodeno dos animais sensibilizados com carne de rã.

	<i>RTT</i>	<i>GGR</i>
Altura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ )	729,33 $\pm$ 54,76 <sup>a</sup>	556,28 $\pm$ 66,06 <sup>b</sup>
Largura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ )	99,75 $\pm$ 12,03 <sup>a</sup>	81,99 $\pm$ 10,43 <sup>b</sup>
Altura do epitélio ( $\mu\text{m}$ )	37,94 $\pm$ 5,64 <sup>b</sup>	31,37 $\pm$ 3,01 <sup>a</sup>

Mais uma vez evidenciou-se que proteínas, administradas em sua forma nativa, possuem maior possibilidade de sensibilizar e de causar efeitos deletérios em maior proporção do que quando administradas pós-processamento térmico.

Quando analisado o jejuno (Tabela 7) encontramos diferença para o alérgeno rã na largura da vilosidade e espessura da muscular interna.

Tabela 7 - Medidas aferidas no jejuno dos animais sensibilizados com carne de rã.

	<i>RTT</i>	<i>GGR</i>
Largura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ )	$84,72 \pm 7,80^a$	$67,99 \pm 12,23^b$
Espessura da túnica muscular interna ( $\mu\text{m}$ )	$33,39 \pm 1,34^b$	$42,55 \pm 8,03^a$

Para o segmento íleo, encontrou-se diferença estatística nos valores mensurados para profundidade da cripta e muscular interna (Tabela 8). Neste caso, destaca-se a diminuição simultânea da altura média da vilosidade e aumento da profundidade média das criptas dos animais que receberam a gavagem, indicando claramente um processo hiperplásico.

Tabela 8 - Medidas aferidas no íleo dos animais sensibilizados com carne de rã.

	<i>RTT</i>	<i>GGR</i>
Profundidade da cripta ( $\mu\text{m}$ )	$95,41 \pm 11,54^a$	$127,02 \pm 20,77^b$
Espessura da túnica muscular interna ( $\mu\text{m}$ )	$41,56 \pm 1,00^b$	$51,69 \pm 8,73^a$

Quando utilizada a carne de boi como alérgeno, encontramos no duodeno diferença estatisticamente significativa para a altura da vilosidade. Nenhum dos outros parâmetros apresentou alteração.

Tabela 9 - Medidas aferidas no íleo dos animais sensibilizados com carne de boi.

	<i>BTT</i>	<i>GGB</i>
Altura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ )	$587,82 \pm 31,63^a$	$512,11 \pm 15,51^b$

Os grupos controles, CD e CG, apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para MI, AV e LV no duodeno (Tabela 9) e para AE no jejuno, com  $32,98 \mu\text{m}$  no grupo que recebeu o alérgeno tratado termicamente e  $29,01 \mu\text{m}$  no grupo que recebeu gavagem.

Tabela 10 - Medidas aferidas no duodeno dos animais dos grupos controles para alérgeno tratado termicamente e alérgeno via gavagem.

	<i>CD</i>	<i>CG</i>
Altura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ )	$563,97 \pm 64,87^a$	$542,17 \pm 56,05^b$
Largura da vilosidade ( $\mu\text{m}$ )	$98,01 \pm 12,89^a$	$90,29 \pm 5,14^b$
Altura do epitélio ( $\mu\text{m}$ )	$36,80 \pm 3,55^a$	$34,43 \pm 1,60^b$
Espessura da muscular interna ( $\mu\text{m}$ )	$33,83 \pm 5,15^b$	$43,79 \pm 7,79^a$

Estes dados comprovam que a utilização da gavagem pode contribuir para o processo de alteração morfológica intestinal, pois a administração intragástrica apresenta-se mais deletéria que o consumo normal via oral.

## CONCLUSÃO

Evidenciou-se com a comparação entre os parâmetros morfométricos dos modelos experimentais para estudo da alergia alimentar que o tratamento térmico é eficiente na redução do potencial alergênico das proteínas, pois propiciou menores alterações morfométricas no intestino delgado dos animais que receberam o alérgeno na dieta quando comparado aos que receberam o alérgeno via gavagem.

Evidenciou também que existem algumas proteínas mais resistentes que outras no que se refere à desnaturação, uma vez que quando comparados os resultados nos dois modelos, as diferenças principalmente para altura da vilosidade e profundidade da cripta, foram mais proeminentes para os extratos de leite e carne de rã.

Com relação à carne de rã, apesar de ter-se mostrado em uma posição intermediária ao leite e à carne bovina, no que se refere às alterações morfométricas para praticamente todas as variáveis analisadas, ainda é precoce afirmar que sua utilização é segura principalmente naqueles indivíduos com susceptibilidade genética.

Mesmo na literatura os dados sobre sua utilização em substituição a outras fontes protéicas são controversos.

O uso de carnes alternativas, por parte de indivíduos alérgicos, deve ser analisado com cautela partindo-se do princípio de que nenhuma proteína pode ser considerada hipoalergênica, além do que existe a possibilidade de reatividade cruzada entre alimentos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Mofidi S. Nutritional management of pediatric food hypersensitivity. *Allergy* 1999; 54: 352-357.
2. Nowak-Wegrzyn A. Future approaches to food allergy. *Pediatrics* 2003; 111 (6): 1672-1680.
3. Scandolera AJ, Thomaz MC, Kronka RN, Fraga AL, Budiño FEL, Huaynate RAR, Ruiz US, Cristani J. Efeitos de fontes protéicas na dieta sobre a morfologia intestinal e o desenvolvimento pancreático de leitões recém-desmamados. *Rev. Bras. Zootec.* 2005; 34 (6): 1447-1485.
4. Mandir N, Fitzgerald AJ, Goodlad RA. Differences in the effects of age on intestinal proliferation, crypt fission and apoptosis on the small intestine and the colon of the rat. *Int. J. Exp. Path.* 2005; 86:125-130.
5. Verburg M, Renes IB, Meijer HP, Taminiu JAJ, Buller HA, Einerhand AWC, Dekker J. Selective sparing of goblet cells and Paneth cells in the intestine of methotrexate-treated rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000; 279: 1037-1047.
6. Bischoff SC, Mayer J, Nguyen Q, Stolte M, Manns MP. Immunohistological assessment of intestinal eosinophil activation in patients with eosinophilic gastroenteritis and inflammatory bowel disease. *Amer. J. Gastroenterol.* 1999; 94 (12): 3521-3529.

7. Komori H, Meehan TF, Havran WL. Epithelial and mucosal  $\gamma\delta$  T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2006; 18: 534-538.
8. Cordle TC, Winship TR, Schaller JP, Thomas DJ, Buck RH, Ostrom KM, Jacobs JR, Blatter MM, Cho S, Gooch WM, Pickering LK. Immune status of infants fed soy-based formulas with or without added nucleotides for 1 year: Part 2: Immune cell populations. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2002; 34 (2): 145-153.
9. Cummins AG, Jones BJ, Thompson FM. Postnatal epithelial growth of the small intestine in the rat occurs by both crypt fission and crypt hyperplasia. *Dig. Dis. Sci.* 2006; 51 (4): 718-723.
10. Li DF, Nelssen JL, Reddy PG. Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in early weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 1991; 69 (8): 4062-4069.
11. Boratto AJ, Lopes DC, Oliveira RFM, Albino LFT, Sá LM, Oliveira GA. Uso de antibiótico, de probiótico e de homeopatia, em frangos de corte criados em ambiente de conforto, inoculados ou não com *Escherichia coli*. *Rev. Bras. Zootec.* 2004; 33 (6): 1477-1485.
12. Reeves, PG; Nielsen, FH; Fahey, GC. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 1993; 123: 939-951.
13. Saldanha JCS, Gargiulo DL, Silva SS, Carmo-Pinto FH, Andrade MC, Alvarez-Leite JI, Teixeira MM, Cara DC. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2004; 37 (6): 809-815.

14. Motrich RD, Gottero C, Rezzonico Jr C, Rezzonico C, Riera CM, Rivero V. Cow's milk stimulated lymphocyte proliferation and TNF $\alpha$  secretion in hypersensitivity to cow's milk protein. *Clin. Immunol.* 2003; 109: 203-211.
15. Fiocchi A, Restani P, Riva E. Beef allergy in children. *Nutrition* 2000; 16: 454-457.
16. Besler M, Steinhart H, Paschke A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J. Chromatogr.* 2001; 756: 207-228.
17. Host A, Samuelsson EG. Allergic reactions to raw, pasteurized, and homogenized/pasteurized cow milk: a comparison. *Allergy* 1988; 43: 113-117.
18. Sampson HA, McCaskill CC. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. *J. Pediatric.* 1985; 107: 669-675.
19. Suckow MA, Danneman P, Brayton C. *The laboratory mouse.* USA: CRC Press; 2001.
20. Iacono G, Carroccio A, Cavatario F, Montalto G, Cantarero MD, Notarbartolo A. Chronic constipation as a symptom of cow milk allergy. *J. Pediatr.* 1995; 126: 34-39.
21. Machida HM, Smith AG, Gall DG, Trevenen C, Scott RB. Allergic colitis in infancy: clinical and pathologic aspects. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1994; 19: 22-26.
22. Lampinen M, Carlson M, Sangfelt P, Taha Y, Thorn M, Loof L, Raab Y, Venge P. IL-5 and TNF $\alpha$  participate in recruitment of eosinophils to intestinal mucosa in ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 2001; 46 (9): 2004-2009.
23. Chehade M, Berin MC, Sampson HA. Intestinal mast cells are increased in a mouse model of eosinophilic gastroenteritis following oral allergen challenge. *Clin. Immunol. J. Allergy* 2004; 113 (2): 90-95.



24. Teixeira MM, Talvani A, Tafuri Wl, Lukacs NW, Hellewell PG. Eosinophil recruitment into sites of delayed-type hypersensitivity reactions in mice. *J. Leukoc Biol.* 2001; 69 (3): 353-360.
25. Mishra A, Hogan SP, Brandt EB, Rothenberg ME: An etiological role for aeroallergens and eosinophils in experimental esophagitis. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 83-90.
26. Schneeman BO. Gastrintestinal physiology and functions. *Brit. J. Nutr.* 2002; 88 (2):159-163.
27. Rancé F, Kanny G, Dutau, G, Moneret-Vautrin, DA. Food hypersensitivity in children: clinical aspects and distribution of allergens. *Pediatr. Allergy Immunol.* 1999; 10: 33-38.
28. Abreu MLT, Leão MI, Matta SLP. Alterações morfológicas intestinais em leitões desmamados precocemente alimentados com níveis crescentes de farelo de soja. VI Congresso Internacional de Medicina Veterinária em Língua Portuguesa; 1993 Dezembro 06-10; Salvador (BA) p. 394-397.
29. Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat. Biotechnol.* 1996; 14: 1269-1273.30. Beretta B, Conti A, Fiocchi A. Antigenic determinants of bovine serum albumin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2001; 126: 188-195.

## APÊNDICE 1

Valores médios em micrômetros para as variáveis mensuradas no duodeno dos animais sensibilizados que receberam dieta AIN-93G modificada.

<i>Alérgeno</i>	<i>Grupo</i>	<i>Secção</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>
Leite	LTT	Duodeno	Altura vilosidade	685,9364	66,23
			Profundidade cripta	122,8097	11,52
			Largura da vilosidade	113,9406	18,80
			Altura do epitélio	35,4194	5,89
			Espessura da submucosa	14,2378	2,38
			Muscular circular interna	33,2621	2,02
Carne de rã	RTT		Muscular circular externa	39,3614	15,53
			Altura vilosidade	729,3278	54,76
			Profundidade cripta	134,9132	26,60
			Largura da vilosidade	99,7488	12,03
			Altura do epitélio	37,9425	5,64
			Espessura da submucosa	14,7185	1,94
Carne de boi	BTT		Muscular circular interna	44,1240	3,19
			Muscular circular externa	38,9849	3,58
			Altura vilosidade	587,8215	31,63
			Profundidade cripta	137,3618	8,86
			Largura da vilosidade	88,0810	7,26
			Altura do epitélio	34,5715	2,97
Isento	CD	Espessura da submucosa	22,2000	11,58	
		Muscular circular interna	46,0222	15,68	
		Muscular circular externa	33,5613	5,74	
		Altura vilosidade	563,9686	64,87	
		Profundidade cripta	134,3340	29,17	
		Largura da vilosidade	98,0074	12,89	
			Altura do epitélio	36,7956	3,55
			Espessura da submucosa	14,2615	3,77
			Muscular circular interna	33,8283	5,15
			Muscular circular externa	29,3862	5,56

Continuação do Apêndice 1.

<i>Alérgeno</i>	<i>Grupo</i>	<i>Secção</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>
Leite	LTT	Jejuno	Altura vilosidade	432,4318	61,73
			Profundidade cripta	102,3978	5,25
			Largura da vilosidade	91,5312	11,24
			Altura do epitélio	32,4496	3,15
			Espessura da submucosa	12,9057	2,85
			Muscular circular interna	29,2093	4,04
			Muscular circular externa	30,1229	5,48
Carne de rã	RTT		Altura vilosidade	484,8926	88,87
			Profundidade cripta	111,6506	22,51
			Largura da vilosidade	84,7157	7,8
			Altura do epitélio	29,8873	2,64
			Espessura da submucosa	19,3740	5,96
			Muscular circular interna	33,3882	1,34
			Muscular circular externa	34,7335	4,06
Carne de boi	BTT	Altura vilosidade	460,3777	100,49	
		Profundidade cripta	125,6095	17,49	
		Largura da vilosidade	85,3092	18,42	
		Altura do epitélio	29,3360	2,55	
		Espessura da submucosa	19,1487	4,86	
		Muscular circular interna	39,3705	9,63	
		Muscular circular externa	35,4365	6,12	
Isento	CD	Altura vilosidade	536,4382	60,55	
		Profundidade cripta	116,5496	6,71	
		Largura da vilosidade	86,8992	6,03	
		Altura do epitélio	32,9781	3,04	
		Espessura da submucosa	12,5392	5,51	
		Muscular circular interna	41,7691	10,64	
		Muscular circular externa	32,6409	11,07	

Continuação do Apêndice 1.

<i>Alérgeno</i>	<i>Grupos</i>	<i>Secção</i>	<i>Variável</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>
Leite	LTT	Íleo	Altura vilosidade	210,2073	42,45
			Profundidade cripta	104,8394	14,43
			Largura da vilosidade	80,4946	10,06
			Altura do epitélio	30,7139	2,09
			Espessura da submucosa	21,3455	11,21
			Muscular circular interna	33,8435	13,15
			Muscular circular externa	46,0644	3,92
Carne de rã	RTT		Altura vilosidade	253,0312	32,13
			Profundidade cripta	112,5061	11,54
			Largura da vilosidade	89,8130	14,17
			Altura do epitélio	31,6604	4,39
			Espessura da submucosa	14,3197	3,75
			Muscular circular interna	40,2561	1,00
			Muscular circular externa	44,4520	2,43
Leite	BTT		Altura vilosidade	183,4792	24,44
			Profundidade cripta	113,8127	31,44
			Largura da vilosidade	77,0866	5,59
			Altura do epitélio	28,9687	3,86
			Espessura da submucosa	27,0987	12,45
			Muscular circular interna	46,9636	12,76
			Muscular circular externa	43,5294	15,87
Isento	CD	Altura vilosidade	208,2402	21,17	
		Profundidade cripta	102,9447	5,74	
		Largura da vilosidade	76,9473	10,54	
		Altura do epitélio	29,3119	2,51	
		Espessura da submucosa	14,7647	5,78	
		Muscular circular interna	42,4587	11,85	
		Muscular circular externa	41,1492	6,32	

## APÊNDICE 2

Valores médios em micrômetros para as variáveis mensuradas no duodeno dos animais sensibilizados que receberam gavagem.

<i>Alérgeno</i>	<i>Grupo</i>	<i>Secção</i>	<i>Variável</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>
Leite	GGL	Duodeno	Altura vilosidade	565,8265	84,06
			Profundidade cripta	140,0770	16,17
			Largura da vilosidade	85,0136	6,63
			Altura do epitélio	32,6117	2,34
			Espessura da submucosa	16,7706	9,5
			Muscular circular interna	37,5151	13,99
			Muscular circular externa	25,1377	7,13
Carne de rã	GGR		Altura vilosidade	556,2763	66,06
			Profundidade cripta	139,3710	18,72
			Largura da vilosidade	81,9957	10,43
			Altura do epitélio	31,3669	3,01
			Espessura da submucosa	15,7033	5,53
			Muscular circular interna	53,7847	18,13
			Muscular circular externa	39,2968	7,47
Carne de boi	GGB		Altura vilosidade	512,1073	15,51
			Profundidade cripta	145,1738	8,39
			Largura da vilosidade	90,6026	13,57
			Altura do epitélio	34,4418	4,73
			Espessura da submucosa	23,3017	4,6
			Muscular circular interna	51,2388	5,6
			Muscular circular externa	35,4192	2,72
Isento	CG		Altura vilosidade	542,1747	56,05
			Profundidade cripta	147,4815	12,55
			Largura da vilosidade	90,2860	5,14
			Altura do epitélio	34,4137	1,6
			Espessura da submucosa	20,2155	9,01
			Muscular circular interna	43,7928	7,79
			Muscular circular externa	32,0819	6,26

Continuação do Apêndice 2.

<i>Alérgeno</i>	<i>Grupos</i>	<i>Secção</i>	<i>Variável</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>
Leite	GGL	Jejuno	Altura vilosidade	499,8859	143,49
			Profundidade cripta	108,9975	11,13
			Largura da vilosidade	79,7002	12,21
			Altura do epitélio	26,9036	2,17
			Espessura da submucosa	13,0683	5,65
			Muscular circular interna	31,5170	7,56
			Muscular circular externa	31,7052	8,10
Carne de rã	GGR		Altura vilosidade	488,9205	100,4
			Profundidade cripta	114,8363	8,76
			Largura da vilosidade	67,9901	12,23
			Altura do epitélio	25,9806	5,49
			Espessura da submucosa	13,7015	7,27
			Muscular circular interna	42,5502	8,03
			Muscular circular externa	35,5387	6,25
Carne de boi	GGB		Altura vilosidade	406,9145	92,87
			Profundidade cripta	121,0986	18,09
			Largura da vilosidade	84,6545	9,57
			Altura do epitélio	30,1303	2,33
			Espessura da submucosa	18,1243	7,4
			Muscular circular interna	34,4302	6,17
			Muscular circular externa	32,3260	3,86
Isento	CG		Altura vilosidade	430,5901	57,59
			Profundidade cripta	124,2660	15,55
			Largura da vilosidade	72,9328	9,28
			Altura do epitélio	29,0063	2,75
			Espessura da submucosa	18,3826	11,25
			Muscular circular interna	42,2624	4,39
			Muscular circular externa	31,9290	5,71

Continuação do Apêndice 2.

<i>Tratamento</i>	<i>Alérgeno</i>	<i>Secção</i>	<i>Variável</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>
Gavagem	Leite	Íleo	Altura vilosidade	222,5076	53,15
			Profundidade cripta	102,5779	20,13
			Largura da vilosidade	71,4492	12,29
			Altura do epitélio	28,0490	4,26
			Espessura da submucosa	17,3170	4,23
			Muscular circular interna	46,8303	10,94
			Muscular circular externa	37,3679	12,06
Gavagem	Carne de rã		Altura vilosidade	236,9060	35,15
			Profundidade cripta	127,0158	20,77
			Largura da vilosidade	79,8796	14,89
			Altura do epitélio	27,9324	4,41
			Espessura da submucosa	17,3252	3,89
			Muscular circular interna	51,6882	8,73
			Muscular circular externa	40,0671	12,92
Gavagem	Carne de boi	Altura vilosidade	187,0742	13,37	
		Profundidade cripta	98,0379	7,18	
		Largura da vilosidade	81,2854	16,97	
		Altura do epitélio	28,5268	2,56	
		Espessura da submucosa	21,8483	5,05	
		Muscular circular interna	45,4431	7,92	
		Muscular circular externa	45,3957	15,39	
Isento	CG	Altura vilosidade	193,4553	30,82	
		Profundidade cripta	95,2876	8,35	
		Largura da vilosidade	25,0648	7,78	
		Altura do epitélio	29,5902	3,89	
		Espessura da submucosa	16,1120	3,87	
		Muscular circular interna	44,4655	7,48	
		Muscular circular externa	42,5326	8,42	

## CONCLUSÃO GERAL

Observou-se que tanto a pasteurização, cocção a 95°C durante 15 minutos, quanto liofilização ocasionaram modificações nas proteínas constituintes dos alimentos e que o processamento térmico pode, muitas vezes, reduzir o potencial alergênico das proteínas. Mas existem algumas proteínas mais resistentes que outras no que se refere à desnaturação tanto pelo calor quanto pelo frio, dentre elas o leite se destacou como o produto que menos apresentou alterações quando analisado em SDS-PAGE.

Com relação à carne de rã, apesar de ter-se mostrado em uma posição intermediária ao leite e à carne bovina, no que se refere a termo-resistência de suas proteínas constituintes, a literatura ainda é controversa com relação à segurança no consumo deste alimento por pacientes alérgicos.

O uso de carnes alternativas, para indivíduos geneticamente predispostos, precisa de cuidado e de avaliação individual considerando-se que nenhum produto protéico pode ser considerado hipoalergênico e que, a reatividade cruzada entre fontes protéicas propõe um sério problema nutricional para crianças com alergia a alimentos e em particular nas polialérgicas.

Ainda com relação as análise morfométricas nos modelos de alergia alimentar, a carne de rã apresentou-se em uma posição intermediária ao leite e à carne bovina para praticamente todas as variáveis analisadas. É precoce afirmar que sua utilização é segura, principalmente naqueles indivíduos com susceptibilidade genética.