

# **CONIC·SEMESP** **13º Congresso Nacional de Iniciação Científica**

Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904

**TÍTULO:** ESTUDO DA IMUNORREATIVIDADE CONTRA A TILAPIA RENDALLI IN NATURA E DIGERIDA EM SERES HUMANOS COM URTICÁRIA ASSOCIADA À INGESTÃO DE CARNE DE PEIXES.

**CATEGORIA:** CONCLUÍDO

**ÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

**SUBÁREA:** BIOMEDICINA

**INSTITUIÇÃO:** FACULDADE ANHANGUERA DE SANTA BÁRBARA

**AUTOR(ES):** REGIANE PATUSSI DOS SANTOS LIMA, JAISON CASTRO OLIVEIRA

**ORIENTADOR(ES):** CELSO EDUARDO OLIVIER, PRISCILA CRISTINA VAZ BOTOLOZZO

Realização:



Apoio:



## **PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**Estudo da imunorreatividade contra a *Tilapia rendalli in natura* e digerida em seres humanos com urticária associada à ingestão de carne de peixes.**

**Orientador:** Priscila Cristina Vaz Bortolozzo

**Co-orientador/colaborador:** Dr. Celso Eduardo Olivier

**Aluno:** [1] Regiane Patussi Santos Lima, [2] Jaison Castro Oliveira



## **ANHANGUERA EDUCACIONAL S.A.**

Alameda Maria Tereza, nº 2000 · Dois Córregos · Valinhos-SP · CEP 13278-181 · (19) 3512-1700

**Santa Bárbara D'Oeste**

**2013**



## ANHANGUERA EDUCACIONAL S.A.

Alameda Maria Tereza, nº 2000 · Dois Córregos · Valinhos-SP · CEP 13278-181 · (19) 3512-1700

### SUMARIO

1. Resumo do projeto .....	4
2. Introdução .....	5
3. Objetivos .....	7
4. Justificativas .....	8
5. Metodologia .....	8
7. Riscos e Benefícios .....	11
8. Resultados .....	12
10. Conclusões .....	14
12. Referências Bibliográficas .....	17



## ANHANGUERA EDUCACIONAL S.A.

Alameda Maria Tereza, nº 2000 · Dois Córregos · Valinhos-SP · CEP 13278-181 · (19) 3512-1700

### 1. Resumo do projeto

A alergia alimentar é uma condição cuja manifestação é multifacetada e depende de uma série de fatores desencadeantes. As modificações de ordem estrutural que sofrem os alimentos através do processamento industrial, culinário e digestivo podem alterar os epítopos conformacionais dos alérgenos e modificar a imunorreatividade das proteínas nativas. O objetivo deste projeto é estudar as alterações na imunorreatividade associadas com a digestão péptica das proteínas. Como modelo de estudo, elegemos a alergia à Tilapia rendalli, em função da grande incidência de alergia a este peixe em nossa região. Amostras de sangue serão coletadas de pacientes previamente diagnosticados como alérgicos a este alimento por um médico especialista em Alergia e Imunologia através de testes cutâneo-alérgicos específicos. As amostras serão submetidas a estudos de imunorreatividade contra a proteína nativa e contra a proteína digerida em fluido gástrico simulado com pepsina em pH ácido. Os testes utilizados para o estudo da imunorreatividade serão o imunoblote (Western Blotting) para avaliação da imunidade humoral e o teste de inibição de aderência leucocítica para avaliação da imunorreatividade celular.



## **2. Introdução**

A alergia é descrita como uma hipersensibilidade de natureza imunológica, mediada por anticorpos e/ou por mecanismos celulares, Pode ser classificada segundo a natureza da hipersensibilidade, segundo a natureza do alérgeno e segundo o contexto imune em que se apresenta.<sup>1</sup>

A classificação de Gell Coombs (segundo a natureza do mecanismo imune) separa as reações em 4 tipos: as reações do tipo I (imediatas ou anafiláticas) são mediadas por IgE que degranulam diretamente as células efectoras com liberação de autacóides pré e pós-formados. As reações do tipo II, (reações de citotoxicidade) caracterizam-se por interação antígeno e anticorpo, capaz de ativar complemento pelos anticorpos das classes IgG e IgM e estimular a produção de anafilatoxinas que recrutam leucócitos polimorfonucleares. As reações tipo III são ativadas por imunocomplexos circulantes formados entre os antígenos e os anticorpos (IgG, IgM, IgA e ocasionalmente IgE) que ativam o complemento e ativam as células citotóxicas efectoras. As reações tipo IV são medidas por células T sensibilizadas que se proliferam e liberam uma variedade de citocinas após a exposição ao antígeno e não depende de anticorpos séricos específicos.<sup>2</sup>

A alergia alimentar é uma realidade comum em nossos dias, pode manifestar-se por sintomas que interferem na qualidade de vida. Um paciente sensibilizado em contato com alérgeno pode desenvolver reações que vários tipos como a síndrome da alergia oral locais, síndromes gastrointestinais, urticárias, angioedema e ate anafilaxia.<sup>3</sup>

As alergias alimentares são divididas segundo a natureza do alérgeno em 2 classes: A alergia de classe 1 é aquela onde os alérgenos (resistentes à digestão péptica) promovem a sensibilização imune no trato gastrointestinal. Alergia alimentar de classe 2, desenvolve-se contra alérgenos suscetíveis à digestão péptica e geralmente a sensibilização



## ANHANGUERA EDUCACIONAL S.A.

Alameda Maria Tereza, nº 2000 · Dois Córregos · Valinhos-SP · CEP 13278-181 · (19) 3512-1700

ocorre por reatividade cruzada com alérgenos inalatórios com epítomos semelhantes, como ocorre por exemplo na síndrome látex-fruta-pólen.<sup>4</sup>

O processamento dos alimentos pode modificar as propriedades estruturais das proteínas, podendo alterar seus epítomos e modificar a alergenicidade de alimentos. A alergenicidade de um alimento depende de uma série de fatores, como a disposição dos epitomos, lineares ou conformacional e a resistência à digestão do péptica. (5)

A carne de peixe é um alimento consumido em quase todas as partes do mundo. Constitui-se assim um alérgeno comum em quase todas as sociedades humanas é uma das causas mais freqüentes da alergia em adultos.<sup>5</sup>

A Parvalbumina é uma proteína transportadora de cálcio, típica da musculatura de peixes, altamente alergênica, em função da sua resistência à digestão gástrica.<sup>6</sup>

Neste trabalho pretendemos estudar (por meio dos testes Inibição da aderência dos leucócitos e imunoblote) a imunorreatividade das proteínas da carne da tilápia (*Tilapia rendalli*), antes e após a digestão com pepsina, em pacientes alérgicos ao peixe, diagnosticados, através de testes cutâneo-alérgicos.



### **3. Objetivos**

Avaliar as diferenças entre imunorreatividade contra as proteínas *in natura* e digeridas da *Tilapia rendalli* em seres humanos com histórico clínico de urticária associada à ingestão de carne de peixes.

#### **3.1 Quanto a influencia da digestão péptica sobre a imunorreatividade humoral**

**3. 1.1 Hipótese 0:** A imunorreatividade analítica humoral (analisada através do imunoblote) contra a tilápia *in natura* **é equivalente** à imunorreatividade analítica humoral contra a tilápia digerida pela pepsina. ( $p < 0,05$ ).

**3. 1.2 Hipótese 1:** A imunorreatividade analítica humoral (analisada através do imunoblote) contra a tilápia *in natura* **não é equivalente** à imunorreatividade analítica humoral contra a tilápia digerida pela pepsina. ( $p < 0,05$ ).

#### **3.2 Quanto a influencia da digestão péptica sobre a imunorreatividade celular.**

**3. 2.1 Hipótese 0:** A imunorreatividade analítica celular (analisada através do teste de inibição de aderência leucocítica) contra a tilápia *in natura* **é equivalente** à imunorreatividade analítica celular contra a tilápia digerida pela pepsina. ( $p < 0,05$ ).

**3. 2.2 Hipótese 1:** A imunorreatividade analítica celular (analisada através do teste de inibição de aderência leucocítica) contra a tilápia





## ANHANGUERA EDUCACIONAL S.A.

Alameda Maria Tereza, nº 2000 · Dois Córregos · Valinhos-SP · CEP 13278-181 · (19) 3512-1700

*in natura* **não é equivalente** à imunorreatividade analítica celular contra a tilápia digerida pela pepsina. ( $p < 0,05$ ).

### 4. Justificativas

Com base nos estudos podemos traçar novos caminhos no diagnósticos e ate mesmo no tratamento das alergias alimentares.

O estudo da imunorreatividade contra os neo-antígenos decorrentes das modificações fisiológicas ou bioquímicas dos alérgenos originais acrescenta conhecimento sobre as complexas dinâmicas das doenças alérgicas e contribui para a formação de estratégias de tratamento e dessensibilização.<sup>7</sup>

Com a parceria de uma clinica especializada em diagnostico e tratamento de alergias, onde essa empresa estará encaminhados os pacientes com urticária associado ao consumo de peixes, clinicamente diagnosticados, pelo Médico com especialização em alergia, através dos testes cutâneos, para teste laboratoriais (in vitro), teste da inibição da aderência dos leucócitos ( TIAL), e immunoblotting.

Materiais como a proteína da carne da tilápia *in natura*, e para produção do antígeno, será doado por um piscicultor da região, os materiais para os testes laboratoriais, para os TIAL e o Immunoblotting necessários para desenvolvimento do projeto será doado pela instituição Alergoimuno parceira a este projeto.

### 5. Metodologia

Os 30 com urticária associada ao consumo de peixe, positivos ao teste cutâneo a carne da tilápia, serão orientados quanto aos procedimentos e objetivos da pesquisa. Receberão para preenchimento o termo livre e esclarecido e serão encaminhados para realização dos testes laboratoriais onde o voluntario estará na posição sentada e após manobras de assepsias com álcool será coletado



## ANHANGUERA EDUCACIONAL S.A.

Alameda Maria Tereza, nº 2000 · Dois Córregos · Valinhos-SP · CEP 13278-181 · (19) 3512-1700

10 ml de sangue periférico da veia mediana cubital na fossa antecubital ou na dobra do cotovelo por ser a mais larga e mais próxima da superfície da pele de cada paciente, a amostra será distribuídas em um tubo heparinizado e outro seco para realização dos testes *in vitro*.

### 5.1 Metodologias da Digestão.

As amostras de proteínas da tilápia serão extraídas em solução extratora de Coca<sup>8</sup> e após centrifugação para retirada de lipídios e fibras serão quantificadas por espectrofotometria após coloração pelo método de Bradford e diluídas para a concentração de 5mg/ml de proteína.

A simulação de digestão é realizada pelo acréscimo de pepsina na proporção de 0.87g/L<sup>1</sup> em agitação a 37 °C e o pH abaixado para 2, com HCl por 1 minuto, sendo elevado para 7, com hidróxido de sódio e resfriadas para interromper a atividade péptica.

### 6.2 Metodologias do Immunoblotting

Para pesquisa de IgE específica em fase sólida contra o alérgenos, usaremos a preparação de gel de gradiente em poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) utilizando o sistema BioRad Mini Protean Tetra-cell system (BioRad, Hercules, CA, USA) com gel de poliacrilamida em gradiente contínuo (5%T - 20%C resolving gel) (9). A amostras de proteínas purificada (5 mg mL) serão preparadas em tampão contendo 2% SDS e 5% mercapto-etanol e aquecidas por 10 minutos a 90°C para desnaturação e exposição de resíduos para ionização. Uma alíquota de 5 µL, equivalente a 25 µg de proteína sera aplicada a cada poço. Para identificação aproximada dos pesos moleculares utiliza-se um padrão de proteínas pré-corado de 10; 17; 26; 34; 43; 55; 72; 96; 130; 170 kDa (PageRuler®, Fermentas, Hanover, MD, USA). A corrida eletroforética é estimulada com 80 Volts até a visualização da coluna de proteínas atingir a metade do gel sendo depois estimulada com 120 Volts até as proteínas atingirem o fim do gel. Após a corrida eletroforética, as proteínas



## ANHANGUERA EDUCACIONAL S.A.

Alameda Maria Tereza, nº 2000 · Dois Córregos · Valinhos-SP · CEP 13278-181 · (19) 3512-1700

distribuídas no gel de poliacrilamida são transferidas por arraste eletroforético (blot) para uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 µm em sistema de imersão por 15 minutos a 150 mA. Após a transferência as membranas são imersas em solução de gelatina por duas horas para saturar os locais adicionais de ligação protéica da nitrocelulose. Cada membrana é incubada *overnight* com o soro do paciente (50µL em 3 mL de PBS), a 4 °C em agitação pendular de 5 ciclos por minuto. As secções das membranas de nitrocelulose são lavadas em tampão de lavagem (Tween a 0,05% em PBS) por três vezes e a seguir incubadas com IgG de cabra anti-IgE humano por 2 horas, repete a lavagem e novamente ele é incubado com u anti-IgG conjugado em sua porção Fc com peroxidase do rábano (15µl em 3 mL de PBS), em agitação pendular, em temperatura ambiente, por duas horas. As secções das membranas de nitrocelulose são lavadas em tampão de lavagem por três vezes e a seguir reveladas em solução de diaminobenzidina (DAB) a 0,5% em PBS por quinze minutos, adicionando-se após alternadamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400µL para 6mL de H<sub>2</sub>O) e solução colorimétrica com NiSO<sub>4</sub> e CoCl<sub>2</sub> (0,5g + 0,5g em 50 mL H<sub>2</sub>O) até o aparecimento das bandas, quando a reação é interrompida com H<sub>2</sub>O.<sup>9</sup>.

### 6.3 Teste de inibição de aderência leucocítica.

Leucócitos obtidos de amostras de sangue heparinizado obtidos por coleta venosa do antebraço são separados do sangue fresco por sedimentação a 37°C por uma hora. Alíquotas de 100µL de plasma são incubados com 10µL do antígeno da carne da tilápia *in natura* e digerida por 30 minutos em agitação suave (200 rpm). De maneira semelhante, é processada uma alíquota para controle (sem antígeno). Após a incubação, o plasma é alocado em uma câmara hemocitométrica não metalizada por 2 horas em ambiente úmido a 37°C para permitir a aderência dos leucócitos. Os leucócitos são contados, a câmara hemocitométrica é imersa em um becker com PBS a 37°C, durante esse processo a lamínula é gentilmente retirada, sendo colocada uma nova, os leucócitos são contados novamente nos mesmos campos da contagem pré-



## ANHANGUERA EDUCACIONAL S.A.

Alameda Maria Tereza, nº 2000 · Dois Córregos · Valinhos-SP · CEP 13278-181 · (19) 3512-1700

lavagem. A Taxa de Aderência (TA) ou porcentagem de aderência é calculada como à contagem de leucócitos após a lavagem dividido pelo número de leucócitos contados antes da lavagem e multiplicado por 100%. A Taxa de Inibição da Aderência (TIA) é calculada pela proporção entre a taxa de aderência da amostra submetida ao enfrentamento antigênico *ex vivo* e a taxa de aderência da amostra controle, segundo a fórmula:  $TIA = [1 - (TA \text{ amostra enfrentada} / TA \text{ amostra controle})] \times 100\%$ <sup>10</sup>.

### 6.4 Análise das diferenças dos resultados pareados

As variâncias das médias das diferenças entre os resultados pareados serão analisadas por teste t pareado, que consiste em formular uma hipótese nula (H0) e uma hipótese alternativa (H1), calcular o valor de t conforme a fórmula apropriada e aplicá-lo à função densidade de probabilidade da distribuição t de Student medindo o tamanho da área abaixo dessa função para valores maiores ou iguais a t. Essa área representa a probabilidade da média amostral em análise ter apresentado valores observados diferentes da média amostral de referência no caso de a distribuição randômica dos valores e a média nas duas populações for a mesma (valor P). Se a probabilidade da diferença das médias ter ocorrido por acaso for muito pequena, podemos concluir que o resultado observado é estatisticamente relevante. O nível de confiança  $\alpha$  (alfa) é igual a  $1 - P$ .<sup>11-13</sup>

## 7 Riscos e Benefícios.

### 7.1 Riscos.

Existe desconforto mínimo na coleta do sangue que pode ser desagradável pelo aperto do braço pela borracha e pela dor causada pela introdução da agulha. O paciente pode interromper a qualquer momento o



## ANHANGUERA EDUCACIONAL S.A.

Alameda Maria Tereza, nº 2000 · Dois Córregos · Valinhos-SP · CEP 13278-181 · (19) 3512-1700

procedimento. Os materiais usados na coleta de sangue são de uso único, descartáveis e esterilizados, deste modo, não existe risco de transmissão de doenças infecciosas. (acrescentar o uso de equipamentos de segurança)

### 7.2 Benefícios

O benefício trazido pelos testes é o diagnóstico de uma possível alergia a proteína da carne da tilápia. Esta informação é importante para o estabelecimento de uma estratégia de tratamento, para que o paciente e o médico assistente saibam que tipos de alimentos devem ser evitados, e quais podem ser consumidos. Contribuindo assim para o entendimento de como a digestão péptica pode interferir no processo de imunorreatividade contra as proteínas alimentares em geral e da tilápia em particular.

## 8. Resultados

A análise da distribuição dos pesos moleculares do SDS-PAGE com extrato de tilápia demonstrou a distribuição das proteínas no gel em 10 bandas distintas: 100 kDa; 64 kDa; 52 kDa; 44 kDa; 40 kDa; 34 kDa; 30 kDa; 19 kDa; 15 kDa e 12 kDa. A análise do gel corado em Coumassie blue demonstrou que este padrão se desfaz após a digestão com pepsina. (Figura 1).

Dos 30 pacientes com história de reações urticarial seguidas à ingestão de peixe, apenas 8 marcaram bandas no imunoblote (tabela 1), sendo que a única banda consistentemente marcada foi à correspondente aos 100 kDa na corrida feita com o extrato natural de tilápia. Não houve nenhuma marcação na corrida do extrato digerido. (figuras 2 a 10). A análise densitométrica do imunoblote foi feita através da digitalização em escala de cinza das membranas de nitrocelulose com auxílio do software ImageJ (disponibilizado no site <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) que mensura a densidade óptica da imagem. O software de leitura oferece o recurso de inverter a luminosidade da imagem criando um "negativo" que torna a leitura proporcional à marcação. A



## ANHANGUERA EDUCACIONAL S.A.

Alameda Maria Tereza, nº 2000 · Dois Córregos · Valinhos-SP · CEP 13278-181 · (19) 3512-1700

leitura da densidade óptica foi realizada circunscrevendo-se individualmente cada banda. Para corrigir o processo de tonalização da membrana pelo processo de revelação, realize-se a "correção", que consiste em subtrair da leitura da banda, a leitura do "background" correspondente, ou seja, a leitura de uma área correspondente, nas imediações da banda, que não demonstra sinais de marcação.<sup>14</sup>

A média das leituras densitométricas da banda do extrato natural com 100 kDa foi de 16,8 (não existe unidade para a leitura densitométrica). Como não houve marcação de bandas para a corrida do extrato digerido, as leituras foram nulas. O cálculo pelo teste t pareado realizado pelo software Graphpad GraphPad Prism (version 5.0; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) mostrou-se significativo ao nível de  $p = 0,0007$ .

Quanto ao teste de inibição da aderência leucocitária, a taxa média de inibição da aderência para o extrato natural foi de 57,1% e a taxa média de inibição da aderência para o extrato digerido foi de 51,3%. A média das diferenças ao teste t pareado foi de 5,7%, considerada não significativa ( $p = 0,7995$ ).

### 9. DISCUSSÃO

A alergia alimentar pode ser classificada de acordo com a natureza dos alérgenos em alergia de classe 1 ou de classe 2.<sup>15</sup> Na assim chamada alergia alimentar de classe 1, o processo de sensibilização ocorre no trato gastrointestinal. A característica dos alérgenos que eliciam esta classe de alergia é o fato de serem resistentes à digestão gástrica. A alergia alimentar de classe 2 é desencadeada por proteínas suscetíveis à digestão gástrica e só se manifestam quando o processo de digestão péptica está comprometido por qualquer razão (antiácidos, processos infecciosos, acloridia, etc).<sup>16</sup> Neste trabalho, todos os pacientes estudados apresentavam história clínica de reação urticarial aguda ocasional seguida à ingestão de tilápia. A imunorreatividade contra este antígeno foi comprovada através do imunoblote, que mostrou em todos um padrão consistente IgE-mediado contra uma banda proteica



encontrada na faixa de 100 kDa. O fato desta banda de 100 kDa não ter sido encontrada no gel corado pelo Coumassie Blue, nos mostra que esta(s) proteína(s) encontrada(s) nesta banda é (são) suscetível(eis) à digestão péptica, e portanto elicia(m) alergias de classe 2. A informação clínica pertinente neste caso é que nem sempre o paciente apresentará reações alérgicas seguidas à ingestão deste alérgeno, mas somente quando, por qualquer razão, o processo digestivo péptico esteja comprometido.

O processo de sensibilização, por sua vez, geralmente ocorre pelo reconhecimento imunológico dos epítomos dos alérgenos. Os epítomos conformacionais são aqueles reconhecidos pelos anticorpos, e portanto eliciam as reações alérgicas humorais (do tipo I de Gell & Coombs).<sup>2</sup> Os epítomos conformacionais, dependem da estrutura secundária, terciária e quaternária das proteínas, e portanto são rapidamente desestruturados pela digestão péptica. Os epítomos lineares, no entanto, são definidos pela seqüência linear de aminoácidos, que nem sempre é interrompida pela digestão péptica. Os epítomos lineares são apresentados ao sistema imune através pelas células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T e portanto participam das reações de imunorreatividade celular, melhor avaliada pelo teste de inibição da aderência leucocitária. Como não houve alteração significativa dos resultados do teste de inibição da aderência, percebemos que a digestão não alterou a imunorreatividade celular contra as proteínas da tilápia. Esta é uma informação valiosa para o imunoterapeuta, uma vez que a dessensibilização imunológica baseia-se na apresentação tolerogênica de epítomos capazes de serem reconhecidos pelo componente celular do sistema imune.<sup>17</sup>

## **10. Conclusões**

**Quanto a influencia da digestão péptica sobre a imunorreatividade humoral**

Rejeitamos a hipótese 0 e ficamos com a hipótese 1: A imunorreatividade analítica humoral (analisada através do imunoblote) contra a tilápia *in natura* **não é equivalente** à imunorreatividade analítica humoral contra a tilápia digerida pela pepsina. ( $p < 0,05$ ).

**Quanto a influencia da digestão péptica sobre a imunorreatividade celular.**

Rejeitamos a hipótese 1 e ficamos com a hipótese 0: A imunorreatividade analítica celular (analisada através do teste de inibição de aderência leucocítica) contra a tilápia *in natura* **é equivalente** à imunorreatividade analítica celular contra a tilápia digerida pela pepsina. ( $p > 0,05$ ).

## 11.Anexos

**Figura 1**

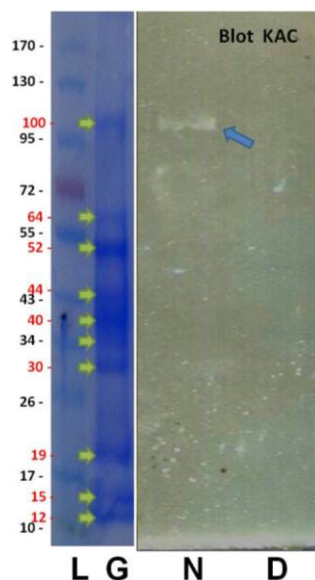


Figura 1: L; Padrão, G; extrato de tilápia em gel de SDS – PAGE,  
Imunoblotting: N; tilápia nativa, D; tilápia digerida





## ANHANGUERA EDUCACIONAL S.A.

Alameda Maria Tereza, nº 2000 · Dois Córregos · Valinhos-SP · CEP 13278-181 · (19) 3512-1700

**Tabela 1**

<b>Iniciais</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>TA Nat</b>	<b>TI Nat</b>	<b>TA Dig</b>	<b>TI Dig</b>	<b>DO</b>
<b>LGF</b>	41	F	100	0	27	73	8
<b>KSVB</b>	29	F	100	0	47	53	29
<b>DLC</b>	55	F	0	100	0	100	17
<b>JFML</b>	51	M	10	90	5	95	23
<b>KAC</b>	31	F	74	26	100	0	24
<b>VGL</b>	6	F	0	100	88	10	7
<b>TVCRS</b>	8	F	0	100	94	6	9
<b>DLN</b>	34	F	52	41	26	74	18
<b>Média</b>	31,8		42	57,1	48,3	51,3	16,8

Tabela 1. Resultados obtidos individualmente com os pacientes e média do grupo.

TA: Taxa de aderência do teste de inibição da aderência leucocitária; Nat: extrato natural; TI: Taxa de inibição do teste de inibição da aderência leucocitária; Dig: extrato digerido; DO: densitometria óptica na banda de 100 kDa do imunoblote na corrida com extrato natural.



## **12.Referências Bibliográficas**

1. Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:717-28.
2. Gell PGH, Coombs RRA. Classification of Allergic Reactions Responsible for Clinical Hypersensitivity and Disease. In: Gell PGH, Coombs RRA, editors. *Clinical Aspects of Immunology*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1968. p. 575-96.
3. Chapman JA, Bernstein L, Lee RE, Oppenheimer JJ. Food allergy: a practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 96:S1-68.
4. Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol* 1996; 14:1269-73.
5. Wasserman S, Watson W. Food allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol*; 7 Suppl 1:S7.
6. Untersmayr E, Poulsen LK, Platzer MH, Pedersen MH, Boltz-Nitulescu G, Skov PS, et al. The effects of gastric digestion on codfish allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:377-82.
7. Olivier CE, Lima RP, Pinto DG, Santos RA, Silva GK, Lorena SL, et al. In search of a tolerance-induction strategy for cow's milk allergies: significant reduction of beta-lactoglobulin allergenicity via transglutaminase/cysteine polymerization. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012.; 67:1171-9.
8. Coca AF, Milford EL. Studies in Specific Hypersensitiveness: XVII. The Preparation of Fluid Extracts and Solutions for Use in the Diagnosis and Treatment of Atopic Conditions. *The Journal of Immunology* 1925; 10:555-66.



## ANHANGUERA EDUCACIONAL S.A.

Alameda Maria Tereza, nº 2000 · Dois Córregos · Valinhos-SP · CEP 13278-181 · (19) 3512-1700

9. Pukac LA, Carter JE, Morrison KS, Karnovsky MJ. Enhancement of diaminobenzidine colorimetric signal in immunoblotting. *Biotechniques* 1997; 23:385-8.
10. Olivier CE, Lima RP, Pinto DG, Santos RA, Silva GK, Lorena SL, et al. In search of a tolerance-induction strategy for cow's milk allergies: significant reduction of beta-lactoglobulin allergenicity via transglutaminase/cysteine polymerization. *Clinics (Sao Paulo)*; 67:1171-9.
11. Tamayo-Sarver JH, Albert JM, Tamayo-Sarver M, Cydulka RK. Advanced statistics: how to determine whether your intervention is different, at least as effective as, or equivalent: a basic introduction. *Acad Emerg Med* 2005; 12:536-42.
12. Linnet K. Limitations of the paired t-test for evaluation of method comparison data. *Clin Chem* 1999; 45:314-5.
13. Guyatt G, Jaeschke R, Heddle N, Cook D, Shannon H, Walter S. Basic statistics for clinicians: 1. Hypothesis testing. *CMAJ* 1995; 152:27-32.
14. Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J. Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* 2009; 30:1845-55.
15. Olivier CE. Food Allergy. *J Allergy Ther* 2013; S3:004 doi: 10.4172/2155-6121.S3-004.
16. Untersmayr E, Jensen-Jarolim E. The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:1301-8; quiz 9-10.
17. Olivier CE, Lima RP, Pinto DG, Santos RA, Silva GK, Lorena SL, et al. In search of a tolerance-induction strategy for cow's milk allergies: significant reduction of beta-lactoglobulin allergenicity via transglutaminase/cysteine polymerization. *Clinics (Sao Paulo)* 2012; 67:1171-9.