



Determinação de IgE a alérgenos alimentares por microarray (ImmunoCAP-ISAC) em pacientes com rinite alérgica

Evaluation of IgE antibodies to food allergens in patients with allergic rhinitis using microarray analysis (ImmunoCAP ISAC)

Laura Maria Lacerda Araujo, MD, MSc¹; Nelson Augusto Rosário Filho, MD, PhD¹

RESUMO

Objetivo: Determinar a frequência de anticorpos IgE a alérgenos alimentares em pacientes com doenças alérgicas respiratórias por análise molecular. **Método:** Este estudo transversal incluiu 101 participantes, com idades entre 6-18 anos, com diagnóstico de rinite alérgica (89,1% com asma associada), sem história de alergia alimentar. Foi realizada análise de IgE sérica específica por ImmunoCAP ISAC, método que emprega biologia molecular para detecção de IgE a componentes alergênicos, sendo 42 alimentares e provenientes das seguintes fontes: abacaxi, aipo, amendoim, avelã, bacalhau, camarão, carpa, castanha de caju, castanha do Pará, cenoura, gergelim, kiwi, leite de vaca, maçã, ovo, pêssego, soja e trigo. Valores $\geq 0,3$ ISU (unidades padronizadas do ISAC) foram considerados positivos. Utilizou-se análise estatística descritiva. **Resultados:** Vinte e sete (26,7%) pacientes apresentaram IgE específica a pelo menos um dos alérgenos alimentares analisados. Entre os 42 componentes alergênicos testados, 20 (47,6%) foram associados a resposta IgE em pelo menos um dos pacientes. Alérgenos com maior frequência de reatividade IgE foram: camarão (Pen a 1 15,8%, Pen i 1 16,8%, Pen m 1 16,8%) e pêssego (Pru p 3 5,9%). **Conclusões:** Este estudo demonstrou que a avaliação de alergia alimentar baseada em análise molecular deve considerar vários elementos, particularmente a correlação com os sintomas clínicos, e o conhecimento sobre reatividade cruzada IgE entre alérgenos das mais variadas fontes. Presença de IgE específica a determinado componente alergênico significa sensibilização, e não necessariamente alergia. Diagnóstico incorreto de alergia alimentar pode levar a tratamento inadequado, com dietas restritivas desnecessárias e prejuízo nutricional para os pacientes.

Descritores: Sensibilização, alérgenos alimentares, alergia respiratória, IgE.

ABSTRACT

Objective: To determine the frequency of IgE antibodies to food allergens in patients with respiratory allergic diseases using molecular analysis. **Method:** This cross-sectional study included 101 participants aged 6-18 years, diagnosed with allergic rhinitis (89.1% with associated asthma), and with no history of food allergy. Analysis of serum specific IgE was carried out using the ImmunoCAP ISAC method, which applies molecular biology tools to the detection of different allergens, including 42 derived from foods (pineapple, celery, peanut, hazelnut, codfish, shrimp, carp, cashew nut, Brazil nut, carrot, sesame, kiwi, cow's milk, apple, egg, peach, soy, and wheat). Values ≥ 0.3 ISAC standardized units (ISU) were considered to be positive. Descriptive statistical analysis was used. **Results:** Twenty seven (26.7%) patients presented specific IgE to at least one of the food allergens analyzed. Among the 42 allergic components tested, 20 (47.6%) were associated with IgE responses in at least one patient. The allergens with the highest frequencies of IgE reactivity were shrimp (Pen a 1 15.8%, Pen i 1 16.8%, Pen m 1 16.8%) and peach (Pru p 3 5.9%). **Conclusions:** The present study showed that molecular-based evaluation of food allergies should take several elements into consideration, particularly the correlation with clinical symptoms and the knowledge available on IgE cross-reactivity among allergens from different sources. Presence of specific IgE to one allergen means sensitization, but not necessarily allergy. Misdiagnosis of food allergies may lead to inappropriate treatment, with unnecessarily restrictive diets which could affect the nutritional status of patients.

Keywords: Sensitization, food allergens, respiratory allergy, IgE.

¹ Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR.

Correspondência para:
Laura Maria Lacerda Araujo
E-mail: laura.araujo80@gmail.com

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Submetido em 24/10/2013,
aceito em 25/11/2013.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico baseado na alergia molecular (diagnóstico molecular, DM) é utilizado para mapear a sensibilização alérgica de um paciente em nível molecular, por meio de componentes alergênicos em substituição a extratos alergênicos totais. Desde a sua introdução, no final da década de 1980, quando tecnologia de DNA foi aplicada para clonar e caracterizar moléculas alergênicas, DM vem sendo empregado na prática clínica do alergista^{1,2}. Atualmente, mais de 130 componentes alergênicos estão comercialmente disponíveis para utilização em ensaios para dosagens de IgE específica sérica.

Um dos principais papéis da alergia molecular é no diagnóstico e prevenção da alergia alimentar. O conhecimento de componentes alergênicos aos quais o paciente é sensibilizado pode ajudar a diferenciar se há uma predisposição a reações locais ou sistêmicas e à persistência de sintomas clínicos. Outro aspecto relevante, difícil de ser definido por meio dos métodos tradicionais de detecção de IgE específica (*in vivo* ou *in vitro*), é a identificação de resposta IgE a alérgenos que apresentam estabilidade. Alérgenos que são estáveis ao calor ou à digestão geralmente provocam reações clínicas mais graves, enquanto os componentes alergênicos lábeis, em sua maioria provocam sintomas mais leves². O DM pode ainda diferenciar se há sensibilização genuína a um alérgeno ou se ela ocorre por reatividade cruzada entre componentes alergênicos, ajudando a identificar predisposição a reação após exposição a diferentes fontes alergênicas^{2,3}.

O objetivo deste estudo foi verificar a frequência de resposta IgE a alérgenos alimentares por meio de análise molecular em pacientes com doenças alérgicas respiratórias.

MÉTODOS

Estudo transversal, em que o tamanho da amostra foi limitado pela disponibilidade dos testes moleculares. A seleção dos pacientes não obedeceu a critérios de randomização.

Foram incluídos por conveniência 101 pacientes com diagnóstico de rinite alérgica classificados segundo o documento internacional ARIA- Rinite Alérgica e seu Impacto na Asma⁴, em acompanhamento no ambulatório de Alergia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Nenhum dos pacientes apresentava história de alergia alimentar.

Todos os participantes foram submetidos a teste cutâneo de hipersensibilidade imediata com os seguintes alérgenos: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, *Blattella germanica*, *Lolium multiflorum*, epitélio de cão e de gato (IPI-ASAC Brasil[®]). Utilizou-se técnica em que foram aplicadas gotas do extrato glicerinado, separadas por três centímetros de distância, na superfície volar do

antebraço direito; em seguida, foi realizada leve punção com agulhas calibre 27. Como controle positivo, utilizou-se histamina (10 mg/mL) e como controle negativo, solução salina com glicerina a 50%^{5,6}. Após 15 minutos, foram medidos os diâmetros da reação e o resultado considerado positivo quando a média aritmética entre o maior diâmetro da pápula e a medida perpendicular a ele foi maior ou igual a três milímetros. Foram incluídos os sujeitos que apresentaram teste cutâneo de hipersensibilidade imediata positivo para pelo menos um dos alérgenos testados.

Foi realizada coleta de sangue por punção venosa e, após retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rotações por minuto durante 10 minutos. Os soros foram armazenados em tubos Eppendorf a -80 °C até o envio, em gelo seco, para o laboratório do Centro de Alergia Molecular em Roma-Itália, onde foram realizadas as análises moleculares.

O método utilizado foi o ImmunoCAP ISAC[®] (sigla traduzida do inglês, que significa imunoensaio em fase sólida de multianálises), teste *in vitro* para detecção de anticorpos IgE específicos, que aplica a tecnologia de microarray proteico. A preparação do microarray consiste em dispor um painel de moléculas alergênicas sobre uma lâmina de vidro (75x25 mm) modificada quimicamente através da adição de reagentes como os epoxisilanos ou nitrocelulose, com a finalidade de melhorar a ligação proteica. Cada alérgeno é colocado em triplicata para garantir a confiabilidade do teste. Para a realização do ensaio, foram adicionados 20 µL do soro a ser testado em lâmina de microarray. Alérgenos reconhecidos por anticorpos IgE do paciente foram detectados por anticorpos anti-IgE marcados com substância fluorescente. Os valores foram medidos por *scanner* a laser, gerando resultados semi-quantitativos e classificados em unidades padronizadas, com resultados considerados positivos quando maior ou igual a 0,3 ISU (ISAC *standardized units*)^{3,7}.

Dos 103 componentes alergênicos testados, foi analisada no presente estudo a reatividade IgE aos 42 alérgenos alimentares, originados das seguintes fontes: abacaxi (Ana c 2); aipo (Api g 1.0101); amendoim (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 8.0101); avelã (Cor a 1.0101, Cor a 1.0401, Cor a 8.0101, Cor a 9); bacalhau (Gad c 1.0101); camarão (Pen a 1.0101, Pen i 1, Pen m 1); carpa (Cyp c 1.01); castanha de caju (Ana o 2); castanha do Pará (Ber e 1.0101); cenoura (Dau c 1.0101); gergelim (Ses i 1); kiwi (Act d 1, Act d 2, Act d 5, Act d 11); leite de vaca (Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 8, Bos d lactoferrin); maçã (Mal d 1.0108); ovo (Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal d 5); pêssego (Pru p 1.0101, Pru p 3); soja (Gly m 4.0101, Gly m 5, Gly m 6) e trigo (Tri a 18, Tri a 19, Tri a 19.0101, Tri a 30).

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Os pais ou responsáveis assinaram termo de consentimento livre

e esclarecido e os participantes maiores de 12 anos, termo de assentimento livre e esclarecido. O programa Statistica (Statsoft®) foi utilizado para análise descritiva dos dados obtidos.

RESULTADOS

De um total de 101 pacientes com idades entre 6 e 18 anos (média 10,7 anos), 62 eram do sexo masculino. Todos apresentavam rinite alérgica, com classificação e diagnóstico conforme ARIA de 42,6% com rinite leve e 57,4% com rinite moderada/grave. A maioria tinha asma associada (89,1%), cuja gravidade foi definida como: 47,5% leve; 33,7% moderada; e apenas 7,9% grave, com diagnóstico e classificação conforme GINA⁸. Nenhum paciente tinha história ou sintomas associados a alergia alimentar.

Vinte e sete (26,7%) pacientes apresentaram IgE específica a pelo menos um dos componentes alergênicos derivados de alimentos que foram analisados. Entre os 42 alérgenos alimentares testados, 20 (47,6%) apresentaram reatividade IgE em pelo menos um dos pacientes (Tabela 1). Os que apresentaram maior frequência reatividade IgE foram: camarão (Pen a 1 15,8%; Pen i 1 16,8%; Pen m 1 16,8%) e pêssego (Pru p 3 5,9%).

DISCUSSÃO

O DM permite identificar a presença de IgE específica a vários componentes alergênicos a partir de uma pe-

quena quantidade de soro¹. No entanto, a interpretação dos seus resultados deve ser feita individualmente, de acordo com a história clínica e os sintomas descritos pelo paciente⁹. No presente estudo, nenhum dos participantes apresentava queixas relacionadas a alergia alimentar, porém cerca de ¼ dos paciente exibia sensibilização a algum dos componentes alergênicos derivados de fontes alimentares que foram testados, embora os níveis de IgE específica tenham sido baixos na maioria dos casos.

Uma exceção foram os alérgenos obtidos a partir de espécies de camarão: Pen a 1, Pen m 1 e Pen i 1, que apresentaram alta frequência de reatividade e níveis de IgE mais elevados que os demais. São tropomiosinas altamente homólogas, com sequência de aminoácidos praticamente idêntica (> 97%). Devido a isso, na versão mais atual do painel ImmunoCAP ISAC foi mantido apenas Pen m1, dado o elevado grau de identidade e reatividade cruzada IgE entre elas.

Provavelmente, a presença de anticorpos IgE específicos para camarão ocorreu por reatividade cruzada IgE a tropomiosinas de ácaro (alérgeno Der p 10) e/ou baratas (alérgenos Per a 7 e Bla g 7). A tropomiosina é uma proteína que regula a contração muscular, e é um pan-alérgeno altamente conservado entre invertebrados, com identidade de sequência acima de 80%. É alérgeno principal em camarão, outros crustáceos e moluscos, e está associada à reatividade IgE variável a ácaro e bara-

Tabela 1 - Frequência de positividade a componentes alergênicos alimentares (n = 101)

Fonte alergênica	Nome científico	Componente alergênico	Frequência de reatividade IgE n(%)	ISU média/mediana
Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	Act d 1	1 (0,9)	1,81
		Act d 5	2 (1,9)	0,4
Abacaxi	<i>Ananas comosus</i>	Ana c 2	2 (1,9)	1,4
Castanha de caju	<i>Anacardium occidentale</i>	Ana o 2.0101	2 (1,9)	4,4
Aipo	<i>Apium graveolens</i>	Api g 1.0101	1 (0,9)	7,9
Amendoim	<i>Arachis hypogaea</i>	Ara h 1	2 (1,9)	0,6
		Ara h 3	1 (0,9)	0,5
Leite de vaca	<i>Bos domesticus</i>	Bos d lactoferrin	2 (1,9)	0,9
Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	Cyp c 1.01	1 (0,9)	0,3
Bacalhau	<i>Gadus callarias</i>	Gad c 1.0101	2 (1,9)	0,8
Ovo (ovalbumina)	<i>Gallus domesticus</i>	Gal d 2	1 (0,9)	0,3
Ovo (lisozima)	<i>Gallus domesticus</i>	Gal d 5	1 (0,9)	0,3
Soja	<i>Glycine max</i>	Gly m 4.0101	2 (1,9)	2,4
		Gly m 6	1 (0,9)	0,3
Camarão rosa	<i>Penaeus aztecus</i>	Pen a 1	16 (15,8)	14,8/6,2
Camarão branco indiano	<i>Penaeus indicus</i>	Pen i 1	17 (16,8)	15,7/4,4
Camarão tigre gigante	<i>Penaeus monodon</i>	Pen m 1	17 (16,8)	19,1/6,0
Pêssego	<i>Prunus persica</i>	Pru p 1.0101	1 (0,9)	0,5
		Pru p 3	6 (5,9)	0,9/0,5
Gergelim	<i>Sesamum indicum</i>	Ses i 1	4 (3,9)	1,0/0,9

tas. É também importante proteína associada à resposta IgE a parasitas, incluindo *Ascaris lumbricoides* e *Anisakis simplex*¹⁰. Portanto, a resposta IgE aos componentes Pen a 1, Pen i 1 e Pen m 1 pode refletir reação cruzada com Der p 10, derivado do *Dermatophagoides pteronyssinus*, que mostrou reatividade IgE em 15,8% dos pacientes estudados (dado não apresentado nos resultados), todos com diagnóstico de alergia respiratória. Estes resultados sugerem que a positividade aos componentes alergênicos do camarão nestes casos significa sensibilização, e não alergia alimentar^{10,11}.

Outro componente que apresentou frequência de positividade relativamente alta foi o Pru p 3, derivado do pêssego, cuja proteína é conhecida como LTP (*lipid transfer protein*) e considerada como um marcador de gravidade para reações alérgicas alimentares². LTPs são proteínas estáveis ao calor e à digestão, podendo causar reações cruzadas de maior gravidade com polens⁷. Como os pacientes do estudo são crianças e adolescentes, há possibilidade de desenvolverem sintomas de alergia oral (alergia alimentar relacionada a pólen) ou reações anafiláticas futuramente. As LTPs são consideradas pan-alérgenos e já foi descrita reatividade cruzada entre alimentos e polens que a contém^{12,13}. Embora os participantes do estudo apresentem rinite persistente, encontrou-se que todos os que apresentaram IgE específica ao Pru p 3, eram igualmente positivos ao componente Pla a 2, derivado do plátano (dado não descrito nos resultados). Talvez, em análise mais detalhada, estes pacientes também refiram sintomas de rinite sazonais, pois são moradores da região sul do Brasil, onde são encontrados plátanos e já foi descrita doença polínica¹⁴. Possivelmente alguns deles apresentem reação cruzada entre fruta e pólen pela presença da LTP.

Os alérgenos de aipo Api g 1, pêssego Pru p 1 e soja Gly m 4, encontrados em cerca de 1% dos pacientes, pertencem ao grupo das proteínas PR-10, que têm homólogos em polens e podem causar síndrome da alergia oral após a sua ingestão. Estas proteínas são sensíveis ao calor, portanto se o alimento é ingerido cozido, é bem tolerado².

O alérgeno de abacaxi Ana c 2 é uma bromelina, que é um marcador para determinantes carboidratos com reatividade cruzada (CCDs), existindo em polens e outros alimentos. Sensibilização a CCDs é raramente associada a sintomas clínicos².

É possível que a presença de IgE para esses alérgenos alimentares citados acima reflita reatividade IgE com proteínas PR-10 e LTPs, além de CCDs, presentes em polens, uma vez que os pacientes são da região sul do Brasil.

Por outro lado, os alérgenos de kiwi Act d 1 e Act d 5; castanha de caju Ana o 2.0101; amendoim Ara h 1 e Ara h 3; leite de vaca Bos d lactoferrina; ovo Gal d 2 (ovalbumina) e Gal d 5 (lisozima); soja Gly m 6 e gergelim Ses i 1 são considerados espécie-específicos²; entretanto, os resultados do ImmunoCAP-ISAC para a maioria desses

componentes mostrou níveis médios < 1 ISU (faixa 0,3 a 4,4 USU). O significado clínico da presença de IgE para esses alérgenos, sem presença de sintomas com a ingestão dos mesmos, ainda permanece desconhecido.

Conclui-se que a avaliação de alergia alimentar baseada em análise molecular deve considerar vários elementos, particularmente a correlação com os sintomas clínicos, e o conhecimento sobre reatividade cruzada IgE entre alérgenos das mais variadas fontes. Presença de IgE específica a determinado componente alergênico significa sensibilização, e não necessariamente alergia. Diagnóstico incorreto de alergia alimentar pode levar a tratamento inadequado, com dietas restritivas desnecessárias e prejuízo nutricional para os pacientes. Portanto, para que se faça uso adequado deste método detalhado para detecção de componentes alergênicos, torna-se imprescindível anamnese e coleta de sintomas clínicos rigorosas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Adriano Mari e ao laboratório do Centro de Alergia Molecular (Roma, Itália), por realizar as dosagens de IgE específicas pelo método ImmunoCAP ISAC.

REFERÊNCIAS

1. Mari A. When does a protein become an allergen? Searching for a dynamic definition based on most advanced technology tools. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:1089-94.
2. Canonica GW, Ansotegui JJ, Pawankar R, Schmid-Grendelmeier P, van Hage M, Baena-Cagnani CE, et al. A WAO – ARIA – GA2LEN Consensus document on molecular-based allergy diagnosis. *World Allergy Organization J*. 2013;6:17.
3. Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43:1321-6.
4. Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, Bonini S, Canonica GW, Casale TB, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126:466-76.
5. Pepys S. Skin testing. *Br J Hosp Med*. 1975;14:412-8.
6. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, et al. Practical guide to skin prick test in allergy to aeroallergens. *Allergy*. 2012;67:18-24.
7. Scala E, Alessandri C, Bernardi ML, et al. Cross-sectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23077 subjects using an allergenic molecule-based microarray detection system. *Clin Exp Allergy*. 2010;40:911-21.
8. Global Initiative for Asthma – GINA. Bethesda: Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Treatment and Prevention, 2006. Última atualização: http://www.ginasthma.org/pdf/GINA_Report_2010.pdf.
9. Custovic A, Simpson A. Environmental allergen exposure, sensitization and asthma: from whole population to individuals at risk. *Thorax*. 2004;59:825-72.
10. Arruda LK. The right timing for shrimp tropomyosins. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;160:301-3.
11. Alessandri C, Zennaro D, Zaffiro A, Mari A. Molecular allergology approach to allergic diseases in paediatric age. *It J Pediatr*. 2009;35:29-41.
12. Pascal M, Muñoz-Cano R, Reina Z, Palacín A, Vilella R, Picado C, et al. Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens. *Clin Exp Allergy*. 2012;42:1529-39.
13. Letrán A, Espinazo M, Moreno F. Measurement of IgE to pollen allergen components is helpful in selecting patients for immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013;111:295-7.
14. Dutra BMRS, Rosário Filho NA, Zavadniak AF. Alérgenos inaláveis em Curitiba: uma revisão de sua relevância clínica. *Rev Bras Alerg Immunopatol*. 2001;24:189-95.