



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA - UFDPar

CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA

LORENA BEZERRA DE ARAUJO

**O USO DO TESTE DE ATIVAÇÃO DE BASÓFILOS NO DIAGNÓSTICO DE
PACIENTES ALÉRGICOS À PROTEÍNA DO LEITE DE VACA: UMA REVISÃO DA
LITERATURA**

PARNAÍBA – PI

2024

LORENA BEZERRA DE ARAUJO

**O USO DO TESTE DE ATIVAÇÃO DE BASÓFILOS NO DIAGNÓSTICO DE
PACIENTES ALÉRGICOS À PROTEÍNA DO LEITE DE VACA: UMA REVISÃO DA
LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Delta do Parnaíba –
UFDPAR, como requisito obrigatório para
obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador (a): Prof^ª. Dra. Bruna da Silva Souza.

PARNAÍBA – PI

2024

LORENA BEZERRA DE ARAUJO


**O USO DO TESTE DE ATIVAÇÃO DE BASÓFILOS NO DIAGNÓSTICO DE
PACIENTES ALÉRGICOS À PROTEÍNA DO LEITE DE VACA: UMA REVISÃO DA
LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Delta do Parnaíba –
UFDPAR, como requisito obrigatório para
obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.


Orientador (a): Prof^a. Dra. Bruna da Silva Souza.

Aprovado em: 09/12/2024.


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **BRUNA DA SILVA SOUZA**
Data: 27/12/2024 19:09:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora
Prof^a.Dr^a. Bruna da Silva Souza

Documento assinado digitalmente
 **ANDRE LUIS FERNANDES LOPES**
Data: 06/01/2025 11:59:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Me. André Luís Fernandes Lopes.

Documento assinado digitalmente
 **ANA PATRICIA DE OLIVEIRA**
Data: 07/01/2025 13:54:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Ana Patrícia de Oliveira.

Dedico este trabalho aos meus pais Carlos e Sueli que nas condições que tinham, sempre me proporcionaram o melhor que puderam. Ao meu especial avô Abelardo, pelo seu desejo e sonho constante de me ver graduada. E à minha madrinha Eunice e tia Elizangela pelo incentivo de sempre. É por vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pelas maravilhosas e abençoadas oportunidades que foram e que constantemente são dadas a mim, pela dádiva da vida e especialmente neste momento a conclusão da minha tão sonhada formação.

Aos meus pais Carlos e Sueli pelo amor dado, por sempre me incentivarem, apoiarem, caminharem ao meu lado e proporcionarem o melhor para mim como e com o que podiam. Ao meu irmão Vinicius, pelo carinho e suporte. À minha família, pelo encorajamento durante a minha trajetória acadêmica. Aos amigos que já estavam comigo antes dessa jornada e pelas boas amizades feitas ao longo desse curso. Ainda, a todos aqueles que mesmo breve se fizeram especiais em alguma ocasião durante esse percurso. Sem dúvidas o caminhar foi um pouco mais leve por conta de vocês.

À minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Bruna da Silva Souza, pelo acolhimento prestado, ajuda e ensinamentos durante a produção deste trabalho.

Meu muito obrigada e minha eterna gratidão a todos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Definição da estratégia PCC.....	25
Tabela 2. Principais resultados obtidos dos artigos inclusos na revisão.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Apresentações de fita (A) e superfície molecular (B) de α -lactalbumina. Os terminais N e C estão indicados em A. Os epítomos de ligação à IgE são coloridos e formam uma mancha exposta à superfície.....	17
Figura 2: Princípio do BAT.....	22
Figura 3: Fluxograma descrevendo a seleção de artigos.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Contextualização da Alergia ao Leite de Vaca	14
2.2 Fisiopatologia da Alergia ao Leite de Vaca	15
2.3 Antígenos do Leite de Vaca	16
2.4 Métodos Tradicionais de Diagnóstico	19
2.4.1 Desafio alimentar duplo-cego controlado por placebo (DADCCP)	19
2.4.2 Testes Cutâneos	20
2.4.3 Teste de patch de atopia (TPA)	21
2.4.4 Medição de IgE específica para alérgenos do leite de vaca	21
2.4.5 Alérgenos naturais e recombinantes purificados do leite de vaca	22
2.4.6 Teste de Ativação de Basófilos (TAB)	22
2.4.7 Vantagens e desvantagens do Teste de Ativação de Basófilos	25
2.4.8 Tratamento	25
3. METODOLOGIA	26
3.1 Caracterização da pesquisa	26
3.2 Estratégia de busca	26
3.3 Critérios de inclusão e exclusão	27
3.4 Extração dos dados	27
4 RESULTADOS	29
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO	35
7 REFERÊNCIAS	35
8 ANEXOS	41

O Uso do Teste de Ativação de Basófilos no Diagnóstico de Pacientes Alérgicos à Proteína do Leite de Vaca:

Lorena Bezerra de Araujo¹

Endereço ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-8772-0627>

Bruna da Silva Souza²

Endereço ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3729-4316>

RESUMO

Introdução: O Teste de Ativação de Basófilos (TAB) é um teste *in vitro* que avalia a ativação de basófilos, após a exposição a alérgenos específicos. O teste utiliza citometria de fluxo para quantificar marcadores como o CD63 e CD203c, que indicam a ativação dos basófilos ao entrarem em contato com anticorpos IgE específicos. Tem sido utilizado no diagnóstico de Alergia à Proteína do Leite de Vaca (APLV), caracterizada por reações adversas mediadas pelo sistema imune, podendo afetar vários sistemas do corpo como a pele, trato respiratório e cardiovascular e impactar a qualidade de vida dos pacientes, podendo em alguns casos resultar em anafilaxia, uma reação extrema, grave e potencialmente fatal devido ao contato com alérgenos. O diagnóstico da APLV envolve testes como: Teste de Provocação Oral com alimentos (TPO), Medição de IgE específica (sIgE) e Testes Cutâneos. Os Testes de Provocação Oral e Testes Cutâneos, podem desencadear uma reação alérgica aguda e reações adversas, respectivamente. A Medição de sIgE detecta anticorpos IgE que se associam a um extrato alergênico ou a um componente molecular específico. **Objetivo:** Analisar a eficácia do Teste de Ativação de Basófilos como método diagnóstico para alergia à proteína do leite de vaca. **Metodologia:** Foi realizada uma revisão integrativa da literatura cujo levantamento bibliográfico realizou-se com as palavras-chave *teste de ativação de basófilo; alergia e leite de vaca* nas bases de dados Public Medline (PubMed) e ScienceDirect, com estudos publicados entre 2014 e 2024 e disponíveis na íntegra nos idiomas Inglês ou Português. Foram incluídos 11 artigos para leitura completa. Estudos não disponíveis na íntegra foram excluídos, além daqueles que não abordavam diretamente o tema, resumos de conferências, editoriais, resenhas, opiniões ou artigos publicados em jornais e revistas não acadêmicas, teses e dissertações e artigos duplicados. **Resultados:** O BAT permitiu avaliar a sensibilidade de indivíduos a alérgenos específicos sem a necessidade da realização do teste de provocação oral, permitindo a simulação de uma ocorrência clínica. Demonstrou alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de APLV, além de apresentar maior valor preditivo negativo em comparação com outros testes diagnósticos. Comparações entre a medição de sIgE e BAT mostrou precisão diagnóstica maior para o BAT. Ainda, indicou uma diferenciação entre pacientes alérgicos daqueles que são sensibilizados. Além disso, o BAT mostrou ser eficaz na avaliação da gravidade e limiar de reações alérgicas, reduzindo a necessidade de TPO. **Conclusão:** O BAT é uma ferramenta promissora no diagnóstico de alergia ao leite de vaca, assim como em alergias ao amendoim e ovo. Apresentou vantagens como a não interferência de anti-histamínicos nos resultados e sua capacidade de avaliar tanto reações mediadas quanto não mediadas por IgE. No entanto, o método requer mais estudos para padronização e

1 Graduanda do curso de Biomedicina da Universidade Federal do Delta do Parnaíba - UFDPAr; E-mail: lorenaaraujo@ufpi.edu.br

2 Professora do Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr; E-mail: brunassouza@ufdpar.edu.br

validação. Assim, o BAT pode complementar o diagnóstico tradicional, reduzindo a necessidade de testes invasivos e potencialmente perigosos como o TPO.

Palavras-chave

Teste de Ativação de Basófilo; alergia; leite de vaca

The Use of the Basophil Activation Test in the Diagnosis of Patients Allergic to Cow's Milk Protein:

A Literature Review

ABSTRACT

Introduction: The Basophil Activation Test (BAT) is an in vitro diagnostic tool that evaluates basophil activation upon exposure to specific allergens. It employs flow cytometry to quantify markers such as CD63 and CD203c, which indicate basophil activation in response to allergens bound to specific IgE antibodies. BAT has been widely used in diagnosing Cow's Milk Protein Allergy (CMPA), a condition characterized by immune-mediated adverse reactions. CMPA can affect multiple organ systems, including the skin, respiratory, and cardiovascular systems, significantly impairing patients' quality of life and, in some cases, leading to anaphylaxis—a severe, potentially fatal reaction to allergen exposure. The diagnosis of CMPA often involves methods such as the Oral Food Challenge (OFC), specific IgE (sIgE) measurement, and skin tests. While these tests are useful, OFC can provoke acute allergic reactions, and skin tests may lead to adverse responses. sIgE measurement, for instance, detects IgE antibodies that bind to allergenic extracts or specific molecular components. **Objective:** To evaluate the efficacy of the Basophil Activation Test as a diagnostic method for cow's milk protein allergy. **Methodology:** An integrative literature review was conducted. The bibliographic search utilized the keywords basophil activation test, allergy, and cow's milk in the PubMed and ScienceDirect databases, focusing on studies published between 2014 and 2024, available in full text in English or Portuguese. Eleven articles were included. Excluded materials comprised non-available full texts, studies not directly addressing the topic, conference abstracts, editorials, reviews, opinion pieces, articles from non-academic sources, theses, dissertations, and duplicates. **Results:** BAT demonstrated the ability to assess individual sensitivity to specific allergens without the need for oral provocation, effectively simulating clinical allergic reactions. The test showed high sensitivity and specificity in diagnosing CMPA, with a higher negative predictive value compared to other diagnostic tools. When compared to sIgE measurement, BAT exhibited greater diagnostic accuracy and enabled differentiation between allergic patients and those merely sensitized. Furthermore, BAT proved effective in assessing the severity and threshold of allergic reactions, potentially reducing the need for OFC. **Conclusion:** BAT is a promising diagnostic tool for cow's milk protein allergy, as well as for other food allergies such as peanut and egg allergies. Its advantages include non-interference by antihistamines and the ability to evaluate both IgE-mediated and non-IgE-mediated reactions. However, further studies are necessary to standardize and validate the method. BAT could complement traditional diagnostic approaches, reducing reliance on invasive and potentially hazardous tests like OFC.

Keywords: Basophil Activation Test; allergy; cow's milk

Submetido em: XX/XX/2024 – **Aprovado em:** XX/XX/2024 – **Publicado em:** XX/XX/2024

1 INTRODUÇÃO

A Alergia Alimentar (AA) é uma condição crônica que pode ser fatal e que está se tornando cada vez mais prevalente em todo o mundo. Trata-se de uma resposta adversa a determinados alimentos, mediada pelo sistema imunológico do indivíduo (NAMAZOVA-BARANOVA *et al.*, 2024; JOHANSSON *et al.*, 2001). Desordens metabólicas, toxinas e reações a aditivos alimentares ou reações com diferentes mecanismos subjacentes (fatores não imunológicos) também são causas que exigem atenção e são consideradas no diagnóstico de alergias alimentares (NAMAZOVA-BARANOVA *et al.*, 2024; JOHANSSON *et al.*, 2001). As alergias podem ser categorizadas em reações mediadas por imunoglobulina E (IgE), não mediadas por IgE e uma combinação de ambas, conforme a ação dos anticorpos IgE em desencadear a reação (RØISGÅRD *et al.*, 2024; SANSÃO, 2003). As alergias alimentares impactam as condições de vida dos pacientes e famílias, além de influenciarem em tarefas diárias e podem ser fatais (YU, FREELAND e NADEAU, 2016; ESCUDERO, 2015; MURARO *et al.*, 2014).

A Alergia Alimentar transformou-se em uma questão de saúde pública global nas últimas décadas, a prevalência cresceu consideravelmente, estimando-se que afete até 45 milhões de crianças e cerca de 12 milhões de adultos mundialmente (ABRIL-GIL *et al.*, 2015; YU, FREELAND e NADEAU, 2016; MOHER, 2009). Nos EUA, 8% das crianças e 11% dos adultos são afetados por alergias alimentares (JIANG *et al.*, 2023). Não há pesquisas ou inquéritos nacionais a respeito da Alergia à Proteína do Leite de Vaca (APLV) no Brasil, mas, em agosto de 2012, o Ministério da Saúde realizou uma coleta de informações nos municípios brasileiros, na qual foi identificada uma média de acompanhamento de 0,4% (0,2% a 0,7%) de crianças com APLV em serviços ou programas de atenção nutricional nesses municípios pelo SUS (COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS, 2018). Mais de 170 alimentos são potenciais causadores de reações alérgicas (PANEL NIAID-SPONSORED EXPERT *et al.*, 2010). Entre os alimentos mais comuns, está o leite de vaca (IWEALA, CHOUDHARY e COMMINS 2018; SICHERER e SAMPSON, 2018). A Alergia Alimentar mediada por imunoglobulina E (IgE) é uma reação do sistema imunológico em alguns pacientes, que pode ocorrer após a ingestão de determinados alimentos, causada pela reticulação do receptor de IgE de alta afinidade (FcεRI) em basófilos e mastócitos por IgEs específicas para alérgenos (ABRIL-GIL *et al.*, 2015; YU, FREELAND e NADEAU, 2016; VITALLÉ *et al.*, 2019).

O leite de vaca é um dos primeiros alimentos a serem incluídos na dieta de uma criança e, por isso, é uma das principais e mais frequentes causas de alergia alimentar nos primeiros anos de vida (KULIG *et al.*, 1999). A alergia a proteína do leite de vaca mediada por IgE é uma alergia alimentar comum, que compromete 2–3% das crianças menores de 3 anos de idade, afetando a pele, trato gastrointestinal, trato respiratório ou o sistema cardiovascular. Uma alta proporção de crianças, aproximadamente 85%, desenvolve uma

tolerância natural. No entanto, aproximadamente 1% dos adultos apresentam reações alérgicas persistentes, geralmente graves e fatais (SAMPSON, 2004; JÄRVINEN e CHATCHATEE, 2009).

A alergia ao leite de vaca mediada por IgE é focada na apresentação clínica típica e pode ser confirmada por meio de uma reação alérgica durante um teste de provocação oral com alimentos (TPO), considerado o método de referência. Ainda como diagnóstico, testes de avaliação de alergia a extratos ou alimentos frescos, como os testes cutâneos de picada, testes cutâneos intradérmicos, além de exames de sangue para identificar a sensibilização por IgE ao alimento suspeito são realizados. Grande parte dos exames de sangue específicos para IgE são imunoensaios que compreendem ensaios imunoenzimáticos (ELISAs), imunoensaios enzimáticos fluorescentes (FEIAs), ensaios quimioluminescentes ou ensaios radioalergoabsorventes (RASTs). Porém, foi recomendado que a utilização dos RASTs fosse interrompida como técnica diagnóstica em prol de ensaios fluorescentes marcados com enzimas mais sensíveis, nos quais um anticorpo fluorescente se liga à sIgE do paciente e a quantidade de IgE circulante é calculada a partir da quantidade de fluorescência (ANSOTEGUI *et al.*, 2020; NIAID e INSTITUTOS NACIONAIS DE SAÚDE, 2010).

Para classificar as reações alérgicas mediadas por IgE, pode-se utilizar o escore de Sampson, um método amplamente utilizado para a classificação de anafilaxia. Devido ao procedimento TPO ser demorado, caro e apresentar riscos de reações alérgicas graves, há uma necessidade de ferramentas diagnósticas complementares (MURARO *et al.*, 2014; SAMPSON, 2003; ANSOTEGUI *et al.*, 2020). O nível de IgE-ab (anticorpo IgE) específico do leite e seus componentes estão associados a reações alérgicas na Alergia à Proteína do Leite de Vaca (APLV), mas podem diferir amplamente entre indivíduos e não predizem a gravidade da reação alérgica (MURARO *et al.*, 2014). A agregação dessas ferramentas de diagnóstico auxilia a diferenciar a APLV de intolerâncias alimentares ou outras reações não imunológicas ao leite.

O leite de vaca consiste em caseínas, representando aproximadamente 80%, constituídas por caseínas (Bos d 8) produzindo α -, β - e κ - caseínas, e proteínas do soro, representando aproximadamente 20% do conteúdo total de proteínas, compostas por lactalbumina (Bos d 4) e β -lactoglobulina (Bos d 5), entre outras proteínas, por exemplo, albumina sérica bovina (Bos d 6), imunoglobulina (Bos d 7) e lactoferrina (MATSUOA, YOKOOJIB e TAOGOSHI, 2015).

A caseína, o principal componente, é potencialmente o constituinte de diagnóstico com melhor desempenho no diagnóstico de Alergia ao Leite de Vaca, mas não existem biomarcadores válidos que possam prever suficientemente a tolerância ou o risco de reações alérgicas graves no TPO (FOONG, DANTZER, WOOD e SANTOS, 2021; FOONG e SANTOS, 2021). A escolha de tratamento para a alergia alimentar é evitar o alimento responsável através da dieta de eliminação, mas esta abordagem nem sempre é possível, especialmente para alimentos básicos (como leite ou ovo), porque têm um papel essencial no bem-estar

psicofísico e sua exclusão completa da dieta às vezes é muito difícil (por exemplo, no caso de alérgenos ocultos). Dessa forma, um biomarcador potencial para uso clínico é a ativação de basófilos e a estimulação *in vitro* de basófilos com caseína, que poderia potencialmente espelhar reações alérgicas a proteínas do leite *in vivo* melhor do que IgE-ab ao leite e caseína (ANSOTEGUI *et al.*, 2020; FOONG, DANTZER, WOOD e SANTOS, 2021; FOONG e SANTOS, 2021; RUBIO *et al.*, 2011; RUINEMANS-KOERTS *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2020). O presente trabalho tem como objetivos, analisar a eficácia do Teste de Ativação de Basófilos (TAB) como método diagnóstico para alergia à proteína do leite de vaca, identificar os benefícios e limitações do TAB e apresentar alguns métodos tradicionais de diagnósticos para alergias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contextualização da Alergia ao Leite de Vaca

Estudos meticulosos acerca da prevalência de Alergia Alimentar mostram que pelo menos nos países ocidentais, tende a ser mais persistente em idade pediátrica e ter taxas mais altas de casos na idade adulta do que anteriormente indicado (GUPTA *et al.*, 2019). A alergia alimentar apresenta variações em sua causa, tipo de alérgeno envolvido e gravidade, o que torna o diagnóstico um desafio. Além disso, a reatividade cruzada entre alérgenos, a presença simultânea de múltiplos alérgenos alimentares e intolerâncias também aumentam a complexidade do diagnóstico (FOONG e SANTOS, 2021). A alergia afeta aproximadamente um terço da população mundial e as taxas estão a aumentar.

Conforme Namazova-Baranova *et al.*, (2024), em um estudo transversal, desenvolvido de 9 de outubro de 2015 a 18 de setembro de 2016, aplicou-se uma pesquisa populacional conduzida online e por telefone onde foi constatado que pessoas brancas não hispânicas de todas as faixas etárias apresentaram incidência de alergias alimentares autodeclaradas ou informadas pelos pais de 9,5% em comparação aos asiáticos 10,5%, hispânicos 10,6% e negros não hispânicos com 10,6%. Além disso, a prevalência de alérgenos alimentares comuns variou de acordo com raça e etnia. Pessoas negras não hispânicas apresentaram maior tendência a relatar alergias a múltiplos alimentos (50,6%). Asiáticos e brancos não hispânicos registraram as menores taxas de reações graves a alérgenos alimentares (asiáticos, 46,9% e brancos não hispânicos, 47,8%) em comparação com indivíduos de outras raças e etnias (NAMAZOVA-BARANOVA *et al.*, 2024).

Ademais, está comprovado que a prevalência de alergia alimentar mediada por IgE verdadeira é consideravelmente menos frequente do que a alergia alimentar reconhecida como condição autorrelatada. Mesmo assim, os dados epidemiológicos evidenciam a dificuldade em diagnosticar a alergia genuinamente mediada por IgE, já que muitos estudos não incluem uma confirmação clínica da doença (WARREN, JIANG e GUPTA, 2020). Entre os alimentos mais comumente relacionados às alergias confirmadas ou autorrelatadas está o leite de vaca, com prevalência autorrelatada de alergia atualizada em um período de 10 anos,

na Europa com 5,7% e prevalência atualizada de alergia ao leite de vaca confirmada por teste de provocação alimentar na Europa com 0,3% (DONA e SUPHIOGLU, 2020; SPOLIDORO *et al.*, 2023). A inclusão do leite de vaca na alimentação faz parte de um costume bastante duradouro, já que relatos mostram a inserção na dieta humana há 9.000 anos. Sintomas cutâneos e gastrointestinais foram relatados por Hipócrates (370 a. C), sendo as primeiras reações adversas a surgirem pós consumo de leite de vaca e logo após quinhentos anos foi mencionada uma correlação entre os sintomas citados e o consumo de leite (HOCHWALLNER *et al.*, 2014; MCGEE, 2004; CHABOT, 1951; O'KEEFE, 1953).

2.2 Fisiopatologia da Alergia ao Leite de Vaca

No contexto da alergia alimentar, o sistema imunológico identifica determinadas proteínas alimentares como alérgenos e reage a elas, desencadeando uma resposta imunológica que resulta em diferentes reações alérgicas e suas manifestações clínicas (MUTHUKUMAR, SELVASEKARAN, LOKANADHAM e CHIDAMBARAM, 2020). As reações alérgicas e outras aos alimentos podem ser agrupadas em: reações envolvendo a pele como a dermatite atópica (DA), o trato respiratório como asma e rinite alérgica, além do sistema cardiovascular, quando se trata de anafilaxias (SAMPSON, 2004; JÄRVINEN e CHATCHATE, 2009; NAMAZOVA-BARANOVA *et al.*, 2024). Crianças com alergia ao leite de vaca não são alérgicas ao leite inteiro, mas a partes específicas que podem se ligar à IgE específica, chamadas de epítomos. Essas proteínas são formadas por uma sequência mais ou menos longa de aminoácidos, e apenas algumas regiões dessa sequência têm a capacidade de se conectar à IgE específica (TSABOURI, DOUROS e PRIFTIS, 2014).

Alguns fatores como, predisposição genética para alergia (atopia), consumo inicial de quantidades pequenas de leite de vaca e fatores associados ao microbioma intestinal podem implicar no aumento do risco em desenvolver alergia ao leite de vaca. Além disso, segundo Savilahti (1981), a crescente prevalência de APLV pode ser atribuída à redução da amamentação e ao aumento do uso de fórmulas à base de leite de vaca. Ademais, outra possibilidade é a sensibilização logo após o nascimento através do consumo de leite de vaca. Por outro lado, existe uma relação evidente entre a exposição materna a alérgenos alimentares durante a gestação vs. a sensibilização alérgica infantil, em que a literatura científica concorda que a exclusão de certos alimentos na gravidez eleva expressivamente o risco de alergias nas crianças.

Pesquisas indicam que o alto consumo materno de leite de vaca e nozes/amendoim no período gestacional diminui a predisposição da prole a desenvolver alergias a esses alimentos. Porém, o mesmo não acontece com a ingestão de proteínas avícolas e amido resistente pela mãe, havendo a possibilidade de o risco de alergias nos descendentes aumentarem (SID *et al.*, 2023). É relatado que a alergia a APLV foi solucionada em 19% das crianças aos 4 anos, 42% aos 8 anos, 64% aos 12 anos e em 79% aos 16 anos de idade, mas, os fatores subjacentes que levaram à tolerância ao LV ainda não são totalmente compreendidos, uma vez que múltiplas causas podem ser parte do desenvolvimento da

tolerância. (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; SKRIPAK, MATSUI, MUDD e WOOD, 2007). As razões podem envolver a diminuição dos anticorpos IgE por causa da evitação, a formação de anticorpos IgG em decorrência do consumo regular de leite de vaca, e a existência de anticorpos IgE direcionados a epítomos conformacionais, ao invés de sequenciais (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; VILA *et al.*, 2001; JARVINEN *et al.*, 2002; HOCHWALLNER *et al.*, 2010).

Ocasionalmente, sintomas associados às reações adversas ao consumo do LV aparecem na lactação, de modo contrário, a maioria do surgimento das reações acontecem posterior a cessação da amamentação e início da ingestão do leite na dieta (KATTAN, COCCO e JARVINEN, 2011; SCHULMEISTER *et al.*, 2008; JARVINEN e SUOMALAINEN, 2001). Existem mecanismos não mediados por IgE de hipersensibilidade ao leite de vaca, além dos mecanismos ligados a IgE, contudo não são fáceis de diagnosticar. Os sintomas não mediados por IgE têm início tardio e aproximadamente 2h a vários dias depois do consumo do leite de vaca os pacientes que possuem essa forma de hipersensibilidade não dispõem de IgE específica para proteína do leite de vaca circulante, apresentando resultados negativos em testes cutâneos de puntura (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; KATTAN, COCCO e JARVINEN, 2011; SAMPSON, 1999; BURKS *et al.*, 1990; PELTO *et al.*, 1999; EWING e ALLEN, 2005; SHEK *et al.*, 2005).

A resposta de IgE humana às proteínas do LV é variável e não foi definido um único alérgeno ou estrutura especial que caracterize a maioria da alergenidade do leite, ocorrendo a sensibilização a várias proteínas em 75% dos indivíduos com ALV, com amplas variações de resposta da IgE, tanto em intensidade e especificidade. Sugere-se que os alérgenos conhecidos como os possíveis causadores são os mais abundantes no CM, sendo as caseínas, α -lactalbumina e β -lactoglobulina (HOCHWALLNER *et al.*, 2010; WAL *et al.*, 1995).

2.3 Antígenos do Leite de Vaca

O leite de vaca contém várias proteínas, algumas das quais são consideradas alérgenos principais, algumas menores, enquanto outras raramente foram associadas a relatos de reações clínicas (AGOSTONI, TERRACCIANO, VARIN e FIOCCHI; 2014). Ele possui em média 30-35g de proteínas por litro e agrega mais de 25 proteínas diferentes, porém como citado, nem todas estão relacionadas à alergenidade. O leite pode ser separado em duas partes: coágulo e soro do leite. Esta separação ocorre por meio da acidificação do leite cru desnatado a pH 4,6 a 20°C, em que o coágulo reúne as proteínas caseína, responsável por 80% e a fração de lactosero inclui as proteínas do soro de leite, totalizando 20% de proteínas do leite (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; WAL e ANN, 2004; JENNESS, 1979; WAL e ANN, 2002).

A porção de caseína (Bos d 8, *Bos domesticus*) compreende quatro proteínas que têm diferentes porcentagem de toda a fração: α S1-caseína (Bos d 9, 32%), α S2-caseína (Bos d 10, 10%), β -caseína (Bos d 11, 28%) e κ - caseína (Bos d 12, 10%), constituindo o alérgeno mais importante da fração, a α S1-caseína (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; SCHULMEISTER *et al.*,

2009). Os segmentos da fração do soro são α -lactalbumina (Bos d 4), β -lactoglobulina (Bos d 5), imunoglobulinas (Bos d 7), albumina sérica bovina (BSA, Bos d 6) e traços de lactoferrina (Bos d lactoferrina). Os alérgenos mais significativos da fração do soro são α -lactalbumina e β -lactoglobulina, respectivamente 5 e 10% que integram no total de proteínas do leite, além disso, existem somente alguns relatos que retratam alergias a outras proteínas do soro, tal como imunoglobulina, BSA ou lactoferrina (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; WAL e ANN, 2004; DOCENA, FERNANDEZ, CHIRDO e FOSSATI, 1996; RESTANI *et al.*, 2009).

As quatro caseínas (α S1-caseína, α S2-caseína, β -caseína e κ -caseína) formam micelas, agregados esféricos com diâmetros variando entre 100 e 300 nm, de modo que esses complexos se ligam a minerais essenciais, como o fosfato de cálcio, que, de outra forma, se precipitariam e não seriam facilmente absorvidos (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; WAL, 1998; MARCHESSEAU, 2002). As quatro moléculas de caseína apresentam baixa similaridade em sua estrutura primária, mas são proteínas fosforiladas e resistentes ao calor e devido à sua conformação reomórfica, não foi possível definir sua estrutura tridimensional (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; SPUERGIN *et al.*, 1997; CASES *et al.*, 2011; MUNOZ MARTIN *et al.*, 2004). As características alergênicas da α S1-caseína, o principal alérgeno do leite de vaca, foram examinadas em sua versão recombinante em *Escherichia coli*; a análise espectroscópica indicou uma conformação predominantemente beta-fold que permaneceu estável mesmo após o aquecimento até 55 °C, porém, de maneira incomum para alérgenos significativos, as caseínas são rapidamente digeridas no sistema intestinal (STANIC *et al.*, 2010).

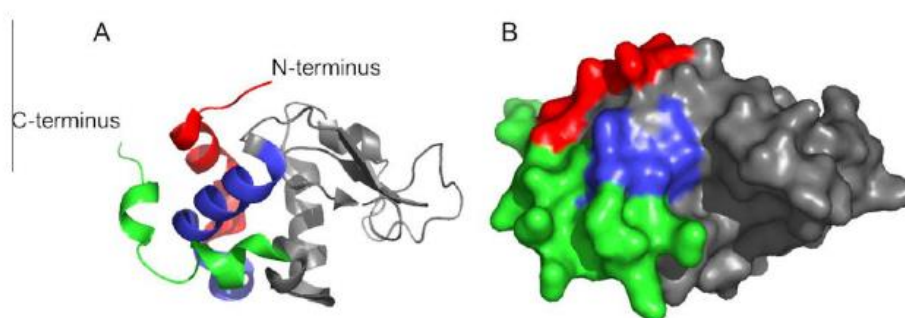
Os epítomos das caseínas e das proteínas do soro do leite são partes de proteínas que se ligam à IgE e podem ser de dois tipos. Um epítomo sequencial ocorre quando uma sequência linear de aminoácidos se liga à IgE, já os epítomos conformacionais resultam do dobramento tridimensional da proteína, formando uma área que se liga à IgE, embora não seja uma sequência linear. Esses epítomos conformacionais são comuns em proteínas do soro do leite e são sensíveis ao calor (AGOSTONI, TERRACCIANO, VARIN e FIOCCHI; 2014). Utilizando peptídeos sintéticos e fragmentos recombinantes, os epítomos dos principais e menores alérgenos do leite de vaca podem ser mapeados, diferente dos alérgenos respiratórios, que possuem principalmente epítomos conformacionais, foram identificados vários epítomos lineares nos alérgenos alimentares.

Na α S1-caseína, esses epítomos sequenciais estão distribuídos ao longo da molécula, sendo termoestáveis, a hidrólise térmica não é suficiente (COMITÊ DE NUTRIÇÃO DA AAP; 2000). Contudo, estudos demonstraram que a α S1-caseína intacta ou fragmentos maiores que reagem com IgE são os principais responsáveis pelas reações alérgicas. Pesquisas em relação a α S2-caseína, β -caseína e κ -caseína também foram analisadas quanto à distribuição de seus epítomos, mas ainda há poucas informações sobre o quão alérgicas elas são em comparação à α S1-caseína (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; SCHULMEISTER *et al.*, 2009; SPUERGIN *et al.*, 1996, CHATCHATEE *et al.*, 2001; ELSAYED, HILL e DO, 2004; HAN *et al.*, 2008; CERECEDO *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2009).

A β -lactoglobulina é uma proteína pequena de peso molecular 18,3 kDa que se dispõe de forma globular, formada por 162 aminoácidos e está evidentemente na forma dimérica além de ser a principal proteína de soro do leite da maioria dos mamíferos. Até o momento, a finalidade desta proteína é desconhecida, mas sabe-se que pertence às lipocalinas e ligam-se a ligantes hidrofóbicos como colesterol e vitamina D2 (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; ADAMS *et al.*, 2006; BELLOQUE, SMITH e DAIRY, 1998; FOGOLARI *et al.*, 1998; KUWATA *et al.*, 1998; UHRINOVA *et al.*, 2000; NIEMI *et al.*, 2008; KONTOPIDIS, HOLT, SAWYER e SCI, 2004). A β -lactoglobulina existe em duas principais isoformas, as variantes genéticas A (BLGA) e B (BLGB), que variam nos aminoácidos 64 e 118 (ácido aspártico e valina em BLGA, glicina e alanina em BLGB). Foi demonstrado que a capacidade alergênica dessa molécula tem sido designada a sua alta estabilidade conferida por duas ligações dissulfeto contra proteases e hidrólise ácida, também como a β -lactoglobulina não ser encontrada no leite humano. Porém, novos estudos apontam a α -lactalbumina como o principal alérgeno do soro de leite (WAL, 2004; PAPIZ *et al.*, 1986; HOCHWALLNER *et al.*, 2010).

A α -lactalbumina é uma proteína pequena e monomérica de peso 14 kDa, ácida e estabilizada por quatro ligações dissulfeto, pertencente à família de proteínas de ligação ao íon Ca^{2+} , importante na participação da regulação da síntese de lactose no sistema da galactosiltransferase e interagem juntamente com membranas lipídicas, ácido esteárico e ácido palmítico (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; PERMYAKOV, BERLINER e LETT, 2000; CAWThERN *et al.*, 1997). Esta molécula tem capacidade de transformar-se em um estado de glóbulo fundido sob pH ácido e em estado apo em altas temperaturas, além de exibir alta estabilidade térmica e habilidade em se dobrar (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; PERMYAKOV, BERLINER e LETT, 2000; HOCHWALLNER *et al.*, 2010). Utilizando peptídeos sintéticos, foi viável identificar epítomos de IgE dentro desse alérgeno, predominantemente situados nas extremidades N e C-terminais da proteína, próximas à superfície da α -lactoalbumina, definindo uma região reativa a IgE na proteína ilustrada na Figura 1 a seguir.

Figura 1: Apresentações de fita (A) e superfície molecular (B) de α -lactalbumina. Os terminais N e C estão indicados em A. Os epítomos de ligação à IgE são coloridos e formam uma mancha exposta à superfície.



Fonte: Hochwallner *et al.*, 2010.

A disposição dos epítomos de IgE pode ser crucial para a ligação cruzada eficaz dos anticorpos de IgE em células efetoras e pode afetar a atividade alérgica de um alérgeno (HOCHWALLNER *et al.*, 2010). Em relação a outra proteína do soro do leite, lactoferrina, esta é uma glicoproteína composta por 703 aminoácidos e tem um peso molecular de 80 kDa, fazendo parte da família das transferrinas, desempenha funções como antioxidante, possui propriedades antimicrobianas e atua na defesa contra infecções. Por sua vez, a albumina sérica bovina (ASB), que contém 582 aminoácidos e pesa 66,3 kDa, desempenha um papel crucial no transporte de substâncias, no metabolismo, na distribuição de ligantes, na manutenção da pressão osmótica e na proteção contra radicais livres. Além de ser um alérgeno significativo na alergia à proteína do leite de vaca, a BSA também está associada a reações alérgicas à carne bovina (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; WAL, 2002; HIRAYAMA, AKASHI, FURUYA e FUKUHARA, 1990; FARRELL *et al.*, 2004; RESTANI *et al.* 2004).

2.4 Métodos Tradicionais de Diagnóstico

2.4.1 Desafio alimentar duplo-cego controlado por placebo (DADCCP)

O Desafio alimentar duplo-cego controlado por placebo (DADCCP) é um teste padronizado e realizado para que haja um diagnóstico preciso a fim de evitar que o paciente esteja sujeito a dietas desnecessárias (NIGGEMANN, 2010). O passo a passo é feito de acordo com um protocolo padronizado em que os pacientes ingerem quantidades crescentes de LV e há a interrupção do desafio assim que reações adversas (teste positivo) ou após consumo de uma quantidade notável sem reações (teste negativo) surgirem. Um teste alimentar aberto pode ser utilizado para verificar resultados negativos. Se houver resultados positivos, é necessário realizar um teste duplo-cego controlado por placebo para eliminar possíveis vieses (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; BINDSLEV-JENSEN, 1998). Pacientes sensibilizados a uma porção de alimento com base apenas na história clínica ou resultado positivo em um teste de triagem pode não reagir ao mesmo alimento em um DADCCP, o que implica que a sensibilização não indica necessariamente a presença de alergias alimentares (TANG e MULLINS, 2017; SPERGEL, 2015).

O desafio alimentar é considerado positivo quanto mais rapidamente os sintomas surgirem e mais sistemas orgânicos forem afetados. O paciente deve ser exposto até que apareçam sintomas claros, sem comprometer sua segurança, porém, o teste duplo-cego controlado por placebo (DADCCP), apesar de ser útil para determinar a menor dose que pode desencadear uma reação alérgica aguda, não é ideal para prever o risco de uma reação após o consumo de leite de vaca, pois não considera todos os fatores de risco. Além do mais, embora seja um método de diagnóstico confiável, tem desvantagens significativas: é demorado, custoso, deve ser somente realizado sob supervisão médica e pode induzir um risco grave de reações anafiláticas (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; DAMBACHER *et al.*, 2013; NIGGEMANN, 2010; MACGLASHAN, 2013).

2.4.2 Testes Cutâneos

Alguns testes cutâneos são utilizados para o diagnóstico de alergias, entre eles: o teste cutâneo de picada (TCP) e o teste cutâneo intradérmico (TDI). Um teste cutâneo de picada é uma opção rápida e de baixo custo para identificar a sensibilização em distúrbios mediados por IgE, constitui a primeira etapa no diagnóstico de alergia de tipo I, imediata e mediada por IgE. É um método seguro, com elevada sensibilidade e boa especificidade, desde que seja conduzido e interpretado de maneira adequada. Uma variação específica dos testes cutâneos de tipo I é o teste picada a picada (PPT), que utiliza alérgenos naturais. Com este propósito, é feita uma picada com uma lanceta na epiderme do paciente utilizando um extrato comercial de leite de vaca ou leite fresco ou componentes alérgenos individuais simples e um controle de solução salina-glicerina. Ao introduzir um alérgeno específico na pele de uma pessoa alérgica, os mastócitos da pele liberam histamina e outros mediadores, devido à ligação da IgE específica do alérgeno aos seus receptores. Isso provoca uma reação imediata na pele, que se manifesta como uma pápula (às vezes com pequenas extensões) cercada por vermelhidão. A dimensão dessa reação é medida para avaliar o nível de sensibilidade da pele ao alérgeno. No caso de pacientes que possuam anticorpos IgE contra o alérgeno alimentar causador, uma pápula maior que o controle salino surgirá (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; BENHAMOU *et al.*, 2009).

Adicionalmente, o teste cutâneo intradérmico pode ser empregado para analisar tanto a alergia imediata mediada por IgE quanto a hipersensibilidade de tipo tardio, dependendo do tempo de avaliação, disponibiliza de maior sensibilidade, porém menor especificidade, em comparação ao teste de puntura (TP). Quando utilizado para diagnóstico de alergia mediada por IgE, destaca-se por um risco aumentado de reações adversas. A quantidade de alérgenos que são consumidos durante a realização do teste é geralmente de 0,02 ml, injetados via intradérmica através de agulhas pequenas para que haja a formação de uma pequena bolha e posteriormente o resultado seja medido por meio do aumento do tamanho da pápula com reação intensa em 20 minutos. O extrato alergênico precisa de diluição, 10-1000 vezes ou até mais das concentrações utilizadas no SPT, sempre precedido por SPT com controles negativos e positivos. Este método permite que a pele do indivíduo quantifique de forma grosseira a reação contra aquele determinado alérgeno e sequentemente, seu grau de sensibilidade alérgica.

Os testes de alergia com leite fresco são bons para descartar alergias, mas não são muito precisos para confirmar se o leite é o causador da reação. A medida de pápulas (inchaços) durante os testes ajuda a prever reações alérgicas, mas os resultados podem variar bastante dependendo do estudo e da idade da criança. Ao comparar extrato comercial com leite fresco em SPT, Calvani *et al.*, (2007), descobriram que o leite fresco mostra o maior valor preditivo negativo, enquanto a caseína mostra o maior valor preditivo positivo. Sendo assim, pesquisas indicam que a melhor forma de confirmar a alergia é por meio de testes orais, em vez de confiar apenas nos testes cutâneos. As diferenças na composição das proteínas dos

alérgenos aliadas ao fato de que as soluções de teste cutâneo podem estar contaminadas podem afetar os resultados dos testes, mostrando a importância de usar métodos adicionais para um diagnóstico mais confiável (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2002; METZ *et al.*, 2009).

2.4.3 Teste de patch de atopia (TPA)

Os APTs podem ser realizados em pacientes com dermatite atópica ou sintomas gastrointestinais sem IgE específica, assim como em indivíduos com reações tardias após a ingestão de leite de vaca (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; EIGENMANN, 2007). O teste se dá com a aplicação de alérgenos geralmente nas costas do indivíduo por até 48h em um adesivo selado e as reações cutâneas que aparecerem são registradas após a remoção dos adesivos e após outras 24–48 h. Esse exame é indicado para o diagnóstico de esofagite eosinofílica em adultos e crianças, assim como para a detecção precoce de sintomas gastrointestinais após a ingestão de leite de vaca em bebês prematuros e pode ser vantajoso na previsão da tolerância oral em crianças com sintomas gastrointestinais que apresentam APLV não mediada por IgE (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; DUPONT *et al.*, 2010; NOCERINO *et al.*, 2013).

2.4.4 Medição de IgE específica para alérgenos do leite de vaca

A utilização da dosagem de IgE específica é a estratégia de diagnóstico *in vitro* mais frequentemente empregada, sendo usada para identificar anticorpos IgE que se ligam a um extrato alergênico ou a um componente molecular específico. Dessa forma, as IgE específicas são apropriadas para detectar a presença de IgE sérica contra um ou mais alérgenos, desde que a IgE esteja presente e possa ser identificada (ANSOTEGUI *et al.*, 2020).

O teste envolve a coleta de sangue venoso dos pacientes, posteriormente os soros dos pacientes são expostos a alérgenos sólidos associados à matriz (leite de vaca desnatado) e, em seguida, são identificados por um anticorpo marcado secundariamente, específico para a parte Fc da IgE humana. Deste modo, a sensibilidade desse tipo de dosagem de IgE é bastante elevada e por vezes, podem apresentar resultados positivos irrelevantes, tornando imprescindível sempre considerar o histórico clínico na análise dos resultados do teste (HOCHWALLNER, *et al.*, 2014; BENHAMOU *et al.*, 2009; SICHERER e LEUNG, 2006). Constatou-se que cerca de 95% dos pacientes com níveis de IgE específicos do leite acima de 15kUA/L, podem apresentar sintomas clínicos durante um desafio oral (SAMPSON, 2001; SAMPSON e HO, 1997). Apesar do teste possuir alta sensibilidade, os pacientes que sofrem de alergia ao leite de vaca não mediada por IgE não podem ser retidos para esta análise e devem ser testados com um DADCCP (BENHAMOU, TEMPIA, BELLI e EIGENMANN, 2009). Ambos os testes, sIgE e SPT possuem alta sensibilidade, mas baixa especificidade; detectam a sensibilização por IgE específica (sIgE), o que não é o mesmo que alergia alimentar. Em outras palavras, a sensibilização nem sempre resulta no aparecimento de sintomas, mas não apenas isso, os ensaios também precisam de limites de referência confiáveis, levando em consideração fatores como o tipo de alérgeno ou alimento e as características da população

estudada, como a idade e a presença de outras doenças (DE MARTINIS, SIRUFO, SUPPA e GINALDI, 2020).

2.4.5 Alérgenos naturais e recombinantes purificados do leite de vaca

Nos últimos anos, esforços significativos foram feitos para identificar e caracterizar alérgenos relevantes do leite. Atualmente, a utilização de moléculas de alérgenos puros, obtidas de extratos naturais ou produzidas por expressão recombinante, permite diagnósticos mais precisos, identificando os alérgenos que causam a doença (VALENTA, LINHART, SWOBODA e NIEDERBERGER, 2011; VALENTA, TWAROCH e SWOBODA, 2007). Os RNAs mensageiros são extraídos de glândulas mamárias de vacas e convertidos em cDNAs, que codificam alérgenos. Essas sequências são clonadas em vetores e expressas em sistemas como *E. coli* ou células de insetos, se forem necessárias modificações pós-traducionais. Com alérgenos puros e bem caracterizados, é possível mapear epítopos de IgE, IgG e células T utilizando soros de pacientes alérgicos ao leite de vaca. Uma vantagem dos alérgenos produzidos em *E. coli* é que eles não possuem carboidratos, o que impede que sejam detectados por anticorpos IgE específicos de carboidratos, resultando em uma menor quantidade de resultados clinicamente irrelevantes. Os alérgenos recombinantes empregados para diagnóstico apresentam qualidade e concentração bem definidas, além de serem compostos por isoformas exclusivas, enquanto os extratos naturais tendem a ser misturas de diferentes isoformas com diversas atividades biológicas. No caso dos alérgenos do leite, como α S1-caseína e α S2-caseína, eles podem ser obtidos separadamente por meio de tecnologia recombinante, o que não é possível na purificação de extratos naturais. Os alérgenos puros aprimoram o diagnóstico e representam um avanço significativo na transição do diagnóstico baseado em extratos para o diagnóstico resolvido por componente (CRD). Além disso, o uso de proteínas purificadas recombinantes possibilita a identificação de alérgenos de reação cruzada e ajuda a explicar os sintomas alérgicos após o consumo de diferentes alimentos (BOHLE e VIETHS, 2004; SANZ, BLAZQUEZ, e GARCIA, 2011).

2.4.6 Teste de Ativação de Basófilos (TAB)

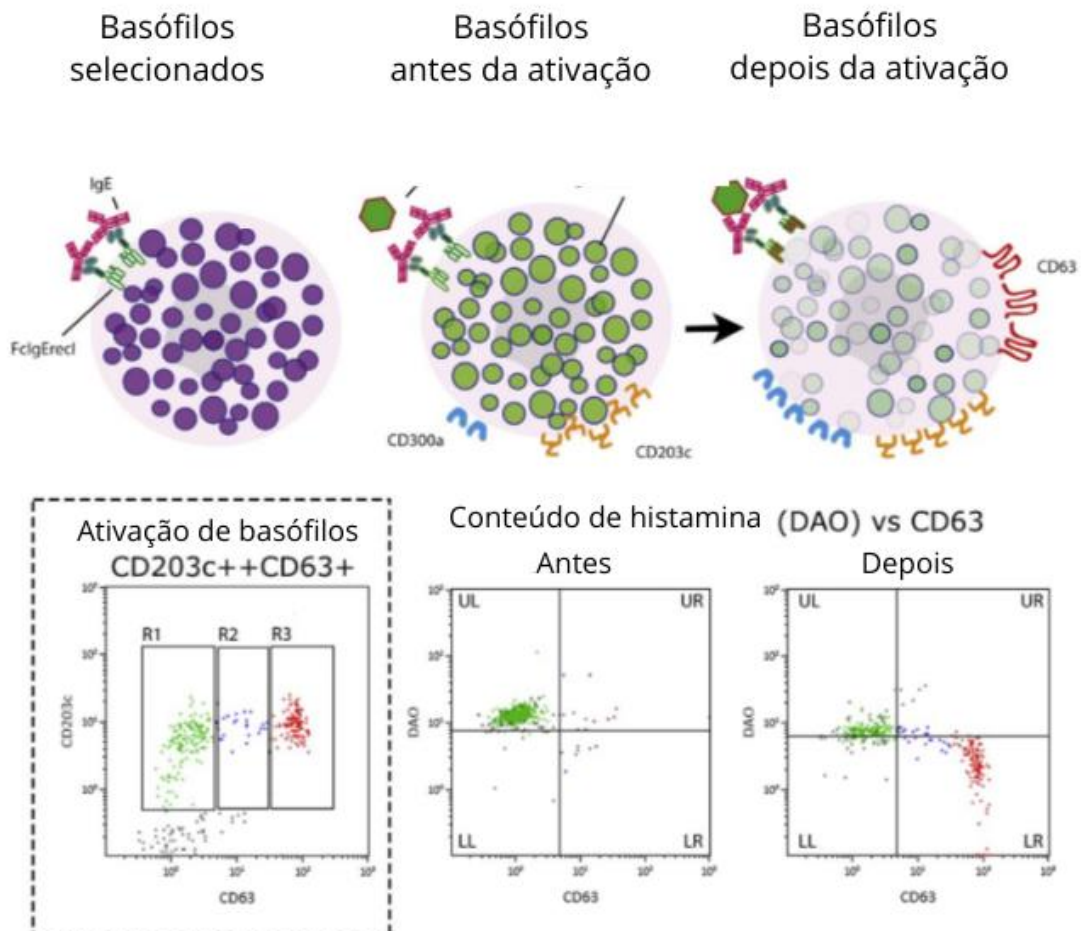
Outra abordagem tem ganhado notoriedade na comunidade científica: o Teste de Ativação de Basófilos (BAT) e superado os ensaios tradicionais de liberação de histamina (DEMOLY, LEBEL e ARNOUX; 2003). O BAT é um teste funcional que avalia a capacidade da IgE de desencadear a ativação dos basófilos após a exposição a alérgenos, um ensaio que utiliza a metodologia de citometria de fluxo para quantificar a expressão de marcadores de ativação, como CD63 e CD203c, na superfície dos basófilos (HEMMINGS, KWOK, MCKENDRY e SANTOS, 2018; HOFFMANN *et al.*, 2015).

Os basófilos, assim como os mastócitos, são reconhecidos como células-chave nas reações de hipersensibilidade imediata que expressam receptores de alta afinidade para IgE (Fc ϵ RI), função que lhes permite carregar anticorpos IgE específicos (sIgE) em sua superfície e culminar em degranulação ao ocorrer a ligação entre esses complexos sIgE/Fc ϵ RI. A

degranulação destas células podem ser identificadas e quantificadas por meio do método de citometria de fluxo (BRIDTS *et al.*, 2014). Acredita-se que estas células estejam estreitamente implicadas em reações alérgicas alimentares, pois sua ativação está associada ao aparecimento de sintomas durante um teste de provocação oral (TPO), independentemente dos níveis de triptase e devido a liberação dos mediadores contidos no citoplasma, estes são, em última análise, responsáveis pelos sintomas alérgicos. (SANSÃO, MENDELSON e ROSEN, 1992; COMMINS *et al.*, 2014, MEULENBROEK *et al.*, 2014).

O basófilo oferece uma opção distinta para investigar a degranulação que depende dos complexos sIgE/FcεRI, diferentemente dos mastócitos, residentes no tecido, que apesar de expressarem FcεRI, não são disponíveis para testes de diagnóstico *in vitro* (MCNEIL *et al.*, 2015). A ativação dos basófilos pode ser avaliada de duas maneiras: pela reatividade, que é o número de basófilos que respondem a um estímulo específico, e pela sensibilidade, que se refere à concentração de alérgenos necessária para ativar metade dos basófilos reativos. Para medir a sensibilidade dos basófilos a alérgenos, é necessário testar a reatividade em 6 a 8 concentrações de alérgenos diferentes. Estudos anteriores mostraram uma correlação entre a ativação dos basófilos e reações alérgicas a proteínas alimentares (SAINTE-LAUDY, VALLON e GUÉRIN, 1994; JOHANSSON *et al.*, 2005; SCHMID, WÜRTZEN, DAHL e HOFFMANN, 2014). O único marcador específico de linhagem basofílica é o CD203c (Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 3, ENPP-3), porém, não é somente um marcador específico, ele também atribui função de ativação de basófilos e a identificação correta desta população é necessária para validar os resultados do teste. Nos basófilos em estado de repouso, o nível de CD203c é baixo, mas quando essas células são ativadas, ocorre um aumento rápido e significativo na quantidade de CD203c. A posteriori, o CD63 (proteína de membrana associada ao lisossomo, LAMP-3) é examinado, confere-se se há o aparecimento positivo e/ou aumento da expressão desse marcador, responsável pela ativação e degranulação que se manifesta durante a atividade de degranulação da célula (EBO *et al.*, 2012). O CD63 tem grande importância em reações alérgicas mediadas por IgE, estando associada à histamina por meio da diamina oxidase intracelular; a degranulação é identificada pela expressão de CD63 na superfície, que, em basófilos em repouso, está presente apenas no lado interno da membrana dos grânulos. (DEPINCE-BERGER, SIDI-YAHYA, JERAIBT e LAMBERT, 2017; EBO *et al.*, 2012). Outros marcadores de ativação ou degranulação também podem ser utilizados, incluindo a análise do conteúdo intracelular de histamina por meio de um método de afinidade enzimática (HistaFlow) (EBO *et al.*, 2012). A figura 2 retrata o princípio do BAT.

Figura 2. Princípio do BAT. Os basófilos apresentam receptores de IgE de alta afinidade (FcγRI) e são capazes de carregar em sua superfície anticorpos IgE específicos (sIgE) e se desgranulam (liberam seu conteúdo intracelular, como histamina) quando o alérgeno faz ligações cruzadas com esses complexos sIgE/FcγRI. Marcadores como o CD203c e CD63 presentes nos basófilos participam dessa ativação e desgranulação.



Fonte: Ansotegui et al., 2020.

Esses ensaios são valiosos para monitorar a progressão clínica da alergia à proteína do leite de vaca e auxiliam na determinação da necessidade de realizar testes de provocação alimentar. Para alérgenos proteicos, um teste que mostre pelo menos 15% de basófilos ativados costuma ser considerado um limite confiável. Além disso, é comum usar um índice de estimulação (comparado ao controle negativo) de pelo menos 2 como critério adicional. Ademais, foram realizados estudos que também avaliaram a ativação de basófilos juntamente com a reatividade de IgE em pacientes com ALV em fórmulas infantis utilizando amostras de sangue periférico na faixa etária de 2 a 15 anos de idade. Nesse caso, critérios de exclusão foram pacientes que fizeram a administração de anti-histamínicos 3 dias antes da data

agendada para a coleta do sangue e remédios, como esteroides atuantes no sistema imune até uma semana antes da data (MATSUBARA *et al.*, 2023).

No presente estudo, utilizou-se quatro fórmulas de leite em pó: PHF1, PHF2, PHWF1 e CMF1. A composição das fórmulas foram as seguintes: PHF1- fórmula parcialmente hidrolisada de soro de leite e caseína, composta por β -lactoglobulina: 75.4 e Caseína: 15.6; PHF2 - β -lactoglobulina: 16.9 e Caseína: 1.08; PHWF1 - fórmula parcialmente hidrolisada de soro de leite, β -lactoglobulina: 82.5 e Caseína: 3.14; CMF1 - fórmula específica de leite de vaca não hidrolisada, utilizada como controle para comparar a alergenicidade e a reatividade com as fórmulas parcialmente hidrolisadas (PHF1, PHF2 e PHWF1). O BAT é realizado em um número restrito de laboratórios, pois a coleta e o armazenamento de sangue para esse tipo de teste exigem condições específicas para manter a viabilidade e funcionalidade das células (por exemplo, a amostra deve ser mantida refrigerada) e deve ser utilizada dentro de 8 horas após a coleta, embora alguns pesquisadores atualmente sugiram que ela pode ser válida por até 24 horas (EBERLEIN, 2020; MUKAI *et al.*, 2017)

2.4.7 Vantagens e desvantagens do Teste de Ativação de Basófilos

Algumas vantagens em se usar o teste referido é a possibilidade do uso contínuo dos anti-histamínicos, pois não afetam os resultados do BAT, por isso não é necessário interrompê-los, ao contrário do que acontece com os testes cutâneos e de provocação. Outro grande benefício é a comparação com os testes de diagnóstico de anticorpos IgE *in vitro*, que é por certo a avaliação do BAT para mecanismos dependentes de IgE, bem como independentes de IgE, devido a ativação dos basófilos ocorrer tanto por vias dependentes de IgE quanto por reações não mediadas por IgE, do mesmo modo que comparações com mastócitos podem ajudar a identificar vias de ativação alternativas, como o receptor MRGPRX. No entanto, a fonte do alérgeno pode implicar em como o BAT pode diferir significativamente de acordo com a variedade empregada (SABATO *et al.*, 2011). O BAT foi sugerido como útil para monitorar a aquisição de tolerância oral a alimentos alergênicos naturalmente ou sob imunoterapia e mostrou alta sensibilidade e especificidade (PATIL, BUNYAVANICH, PHIL e BERIN, 2020; SANTOS e SHREFFLER, 2017).

2.4.8 Tratamento

O mais importante tratamento para alergias alimentares consistia em suspender o consumo dos alérgenos e monitorar eventuais mudanças ao longo do tempo. Contudo, a tolerância espontânea é comum em crianças pequenas, mas ocorre com menor frequência em crianças mais velhas e adultos. (MAZON *et al.*, 2022). Imunoterapia com alérgenos e anticorpos monoclonais dirigidos para IgE, IL-33 ou receptor IL-4/IL-13 têm sido alvo de pesquisas contínuas pelo seu provável potencial de efeito no que tange em modificar a

doença. (REGIÕES C, 2024). Prevenir a sensibilização cutânea e promover a tolerância oral por meio da introdução de alimentos complementares entre 4 e 6 meses de idade, especialmente em bebês de alto risco ou com dermatite atópica, pode contribuir para evitar o surgimento de alergias alimentares na infância (LACK, 2008; HALKEN, 2020; KALB *et al.*, 2024). As diretrizes para a Europa e a América recomendam a amamentação exclusiva durante 4-6 meses e uma introdução tardia de componentes alimentares sólidos em bebês com risco atópico (AGOSTONI *et al.*, 2009).

3 METODOLOGIA

3.1 Caracterização da pesquisa

O presente estudo se estabelece em uma revisão narrativa da literatura, com base na análise de artigos científicos publicados sobre o uso do teste de ativação de basófilos em pacientes alérgicos ao leite de vaca, cujo método envolve a elaboração de uma revisão abrangente da literatura, auxiliando nas discussões sobre métodos e achados de pesquisas, além de fornecer reflexões sobre a realização de estudos futuros. O foco inicial deste método de pesquisa é alcançar uma visão aprofundada acerca de um fenômeno fundamentando-se em estudos anteriores.

3.2 Estratégia de busca

O processo de construção da revisão de literatura foi desenvolvido através de um mecanismo dividido em cinco etapas: 1º) Definição do tema e escolha da hipótese ou questão de pesquisa para a preparação da revisão integrativa; 2º) Definição de critérios para inclusão e exclusão de estudos ou busca na literatura; 3º) Especificação das informações a serem obtidas dos estudos selecionados / classificação dos estudos; 4º) Avaliação dos estudos inseridos na revisão integrativa; 5º) Análise dos resultados; 6º) Exposição da revisão/síntese do conhecimento. Para a pergunta norteadora de pesquisa utilizou-se a estratégia PCC, que emprega o mnemônico *Population, Concept e Context* e se baseia em P sendo População, C - Conceito e C - contexto. A tabela abaixo mostra a organização do método PCC da atual revisão para o detalhamento da formulação da questão do estudo e a definição dos objetivos da análise.

Tabela 1. Definição da estratégia PCC.

Acrônimo	Definição	Critérios de estudo
P	População	Pessoas alérgicas ao leite de vaca
C	Conceito	Teste de ativação de basófilos
C	Contexto	Teste de ativação de basófilos no diagnóstico de alergia ao leite de vaca

Fonte: Autoria própria (2024)

Dessa forma, foi formulada a pergunta: O teste de ativação de basófilo pode ser utilizado como diagnóstico em pacientes alérgicos ao leite de vaca? Assim, as buscas bibliográficas foram realizadas através de pesquisas nas bases de dados Public. Medline (PubMed) e ScienceDirect.

3.3 Critérios de inclusão e exclusão

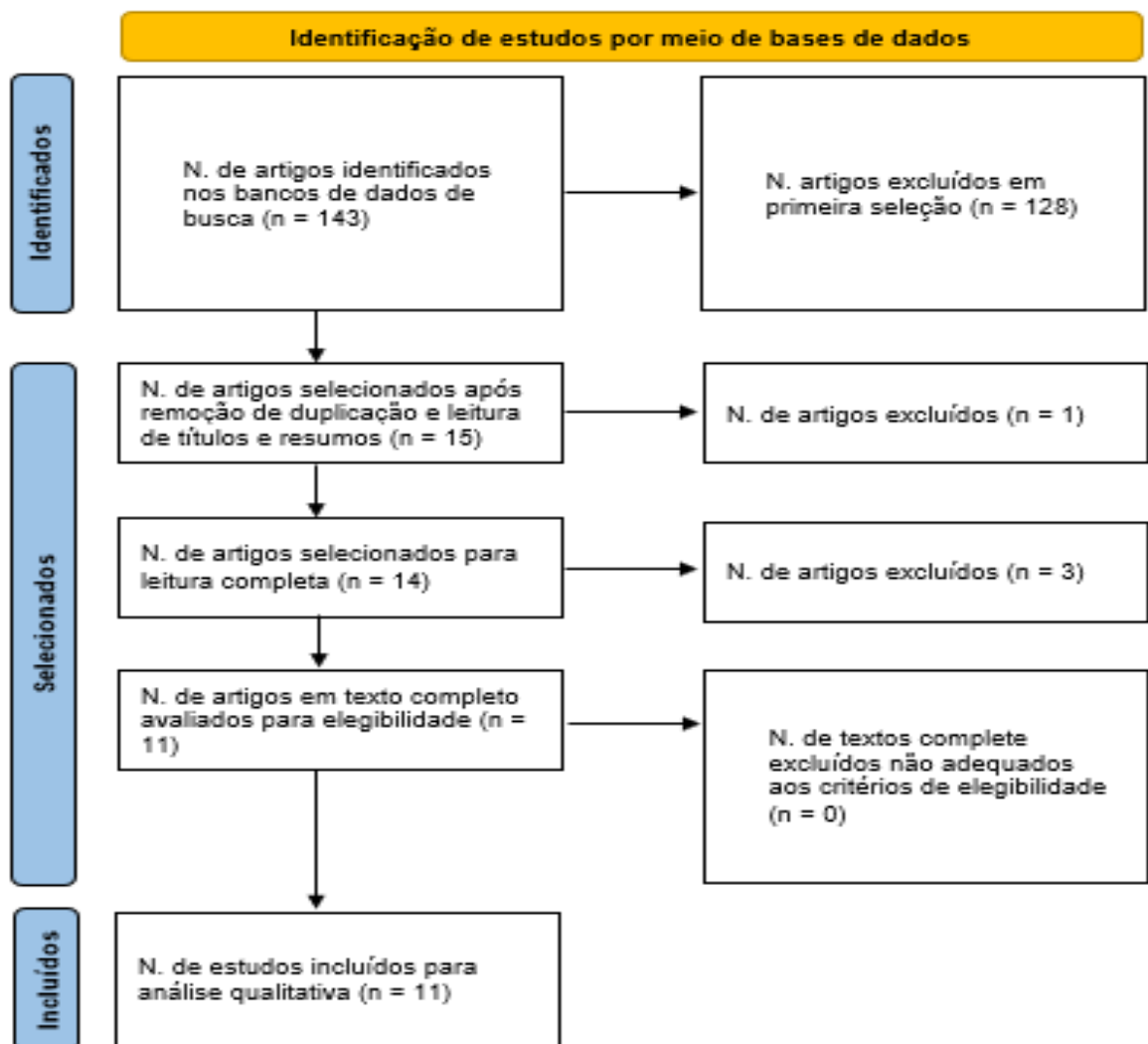
Para serem integrados na revisão foram selecionados: estudos publicados nos últimos 10 anos (2014-2024) cuja versão completa estava acessível de forma gratuita, nos idiomas inglês ou português. Entre os critérios de exclusão estão: estudos que não abordam diretamente o tema de pesquisa ou que se desviam significativamente do foco principal do trabalho; resumos de conferências; estudos que não possuem caráter científico, como editoriais, resenhas, opiniões ou artigos publicados em jornais e revistas não acadêmicas, teses e dissertações; artigos duplicados. Os artigos não disponíveis na íntegra foram excluídos.

3.4 Extração dos dados

Após a estruturação da pergunta de pesquisa, deu início o levantamento bibliográfico com as palavras-chave “teste de ativação de basófilo”; “alergia” e “leite de vaca” nas bases de dados Public. Medline (PubMed) e ScienceDirect. O Operador Booleano “AND” foi utilizado para informar aos bancos de dados como combinar os termos da pesquisa no site de busca. Este termo refere-se à palavra “E” e permitiu que fossem exibidos trabalhos que contivessem todas as palavras-chave digitadas, restringindo o alcance da pesquisa. Inicialmente, foram analisadas as palavras contidas nos títulos, resumos e descritores. Os estudos selecionados que respondiam à questão norteadora desta revisão foram lidos na

íntegra. A etapa de seleção dos estudos compreendeu na identificação, seleção, qualificação e inserção, conforme a estratégia PCC. O processo de seleção está representado na figura 1, baseado no *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses extension for Scoping Reviews* (PRISMA-ScR). Durante a busca nas bases de dados foram identificados um total de 143 artigos, no qual foram selecionados 11 artigos pela leitura de títulos e resumos quanto à qualificação, sendo descartados 132 artigos por não atenderem aos critérios de inclusão. Os 11 artigos que foram selecionados através da triagem (leitura de títulos e resumos) foram submetidos a revisão do conteúdo do texto completo por estarem diretamente relacionados ao objetivo da pesquisa e o tema examinado, excluindo os trabalhos que abordaram assuntos distantes do tema proposto, como observado no fluxograma mostrado na figura 3.

Figura 3. Fluxograma descrevendo a seleção de artigos.



Fonte: Diagrama de Fluxo (PRISMA, 2020).

4 RESULTADOS

De acordo com os estudos obtidos para leitura completa, foi possível listar cada pesquisa com os principais resultados, tipo de estudo utilizado e o método utilizado para a realização dos estudos e consequentemente a obtenção dos resultados acerca do Teste de Ativação de Basófilos e outras técnicas utilizadas.

Tabela 2. Principais resultados obtidos dos artigos incluídos na revisão

Autor, ano	Tipo de estudo	Metodologia	Principais resultados
NAMAZOVA-BARANOVA <i>et al.</i> , 2024	Revisão de Literatura	Revisão de Literatura	Níveis elevados de IgE específica para alimentos ou resultados de testes de punção cutânea não parecem indicar a gravidade das reações alérgicas. No entanto, a elevação da triptase a ser liberada por mastócitos está associada à gravidade da anafilaxia alimentar, apesar de poucas evidências a respeito. Além disso, o teste de ativação de basófilos não deve ser realizado de forma independente do teste de ativação de mastócitos.
HOCHWALLNER <i>et al.</i> , 2014	Revisão de Literatura	Revisão de Literatura	Testes de liberação de histamina e ativação de basófilos são utilizados para avaliar a habilidade dos anticorpos IgE de desencadear a liberação de mediadores, de forma a evitar testes de provocação alimentar.
FIOCCHI <i>et al.</i> , 2016	Revisão de Literatura	Revisão de Literatura	A APLV não mediada por IgE deveria ser melhor definida; Estudos foram feitos sobre o uso de testes de contato e de novos testes, como o

			Teste de Ativação de Basófilos.
ANSOTEGUI <i>et al.</i> , 2020	Revisão Sistemática	Revisão Sistemática	A comparação do teste cutâneo, medição de anticorpos IgE anti-leite de vaca e BAT revelou que o BAT produziu a maior especificidade (90%) e sensibilidade (91%), o maior valor preditivo positivo com 81% e o maior valor preditivo negativo com 96%; A comparação de medições específicas de IgE e BAT revelou uma precisão diagnóstica significativamente maior para o BAT (sensibilidade 86%, especificidade 88%), dados estes confirmados pela ativação de basófilos correlacionados com desafio alimentar controlado por placebo duplo-cego.
MATSUBARA <i>et al.</i> , 2023	Estudo transversal	ELISA, cromatografia líquida de alta pressão e ImmunoCAP	Tanto PHF1 quanto PHWF1 apresentaram capacidade semelhante de ativação de basófilos, embora o PHF2 tenha induzido uma ativação menor, indicando que fórmulas parcialmente hidrolisadas podem ser mais seguras para pacientes com alergia ao leite de vaca (APLV).
MALUCELLI, JUNIOR, MELLO e PRANDO, 2023	Revisão Sistemática de acordo com o Registro	Revisão Sistemática (PROSPERO)	Os resultados do teste de ativação de basófilos (BAT) foram associados a uma reatividade clínica

	Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas (PROSPERO)		mais severa em reações alérgicas ao leite, semelhante ao que foi observado em estudos sobre ovos e leite. Ainda, o BAT tem se mostrado útil na diferenciação entre pacientes alérgicos e aqueles que são sensibilizados, mas clinicamente tolerantes. Quatro dos estudos selecionados indicaram que os resultados do BAT podem servir como biomarcadores para a gravidade e/ou limiar das reações alérgicas ao leite ou amendoim.
HEE KIM <i>et al.</i> , 2020	Observacional e prospectivo	ImmunoCAP	Os níveis de sIgE e a proporção de basófilos com expressão de CD63 foram superiores em indivíduos com alergia ao leite em comparação àqueles sem a condição; A anafilaxia se manifestou em cinco indivíduos alérgicos ao leite (19,2%); Observou uma correlação geral significativa entre o nível de sIgE e a proporção de basófilos com expressão de CD63 em relação ao alérgeno do leite.
RØISGÅRD <i>et al.</i> , 2024	Ensaio clínico randomizado aberto	ImmunoCAP e citometria de fluxo	O CD-sens específico para caseína reagiu em 21 pacientes em um DBPCFC; observou-se que uma forte correspondência positiva entre o CD-sens

				específico para caseína e os níveis de IgE para leite, e uma correlação ainda mais forte entre CD-sens e IgE para caseína. Isso indica que pacientes com maior sensibilização à caseína (CD-sens) tendem a ter níveis mais altos de IgE específicos para leite e caseína.
SCHOCKER <i>et al.</i> , 2019	Estudo observacional analítico		Imunoensaio Enzimático de Fluorescência, Teste Multiplex Dot	O BAT identificou melhor a resposta clínica da APLV; Os resultados demonstraram correlação da atividade dos basófilos com os graus dos sintomas, mas, a ativação dos basófilos deve ser comparada com a ativação de anti-IgE dos pacientes.
NORIEGA, TEODOROWICZ, SVELKOUL e RUI-NEMANS-KOERTS, 2021	Revisão literatura	da	Revisão literatura	da O teste de ativação de basófilos (BAT) é considerado altamente eficaz para aprimorar o diagnóstico da alergia à proteína do leite de vaca (APLV), pois simula a gravidade aguda da condição em relação a alérgenos do leite de vaca e do leite humano. Além disso, o BAT pode ajudar a monitorar o desenvolvimento da APLV, tornando-se uma ferramenta de diagnóstico confiável e econômica quando há suspeita de alergia mediada por IgE, o que

			pode reduzir a necessidade de testes duplo-cegos controlados por placebo (DADCCP).
NUCERA <i>et al.</i> , 2015	Estudo piloto exploratório	Imunoensaio Enzimático Fluorescente	Observou a existência de uma associação entre a aquisição de tolerância clínica ao leite de vaca e a redução da reatividade dos basófilos às proteínas do leite.

5 DISCUSSÃO

Entre os avanços no diagnóstico e manejo de alergias alimentares (AF) e intolerâncias alimentares (IA), destaca-se a importância da diferenciação entre ambas as condições. O uso de testes modernos, como o Teste de Ativação de Basófilos (BAT), aliado ao diagnóstico resolvido por componentes, tem se mostrado uma ferramenta essencial para maior precisão e personalização no cuidado dos pacientes. Testes como o de IgE ou de alergia na pele não conseguem prever se uma alergia será grave, além disso, o aumento da triptase pode indicar uma reação grave, mas ainda faltam estudos que comprovem isso. Os testes que ativam as células de defesa, como o teste de ativação de basófilos e o teste de ativação de mastócitos precisam ser feitos juntos para dar resultados mais precisos, métodos estes que ajudam a evitar restrições dietéticas desnecessárias e melhoram a qualidade de vida dos pacientes. A alergia à proteína do leite de vaca (APLV) é uma condição comum em crianças e envolve diferentes proteínas, como caseína e beta-lactoglobulina. Avanços tecnológicos, como microarrays, permitem diagnósticos mais precisos e a sensibilização precoce pode evoluir para tolerância, a introdução controlada de proteínas lácteas surge como alternativa para reduzir a gravidade da APLV. Testes de liberação de histamina e ativação de basófilos foram utilizados para analisar se o corpo reage de forma alérgica sem a necessidade do indivíduo consumir o alimento, o que torna útil para diagnosticar alergias de forma mais segura (Hochwallner *et al.*, 2014; Namazova-Baranova *et al.*, 2024).

A APLV não mediada por IgE deve ser melhor definida porque ela é diferente da alergia clássica e pode ser difícil de diagnosticar (Fiocchi *et al.*, 2016). Realizou-se uma comparação entre o teste cutâneo, medição de anticorpos IgE anti-leite de vaca e TAB e constatou-se que o Teste de Ativação de Basófilos (TAB) é o mais eficaz. Ele apresentou alta precisão, com 91% de sensibilidade (identifica quem tem alergia) e 90% de especificidade (descarta quem não tem alergia). O TAB também teve o melhor valor preditivo, garantindo que resultados positivos e negativos são mais confiáveis. A eficácia foi confirmada em testes práticos com desafios alimentares controlados. Ademais, fórmulas infantis PHF1 e PHWF1

mostraram uma capacidade similar de ativar basófilos, o que pode indicar que elas têm um potencial de causar uma reação alérgica semelhante. No entanto, a fórmula PHF2 causou uma ativação menor, sugerindo que fórmulas parcialmente hidrolisadas (com proteínas quebradas em pedaços menores) podem ser mais seguras para pessoas com alergia ao leite de vaca. Isso significa que essas fórmulas têm menos chance de causar uma reação alérgica intensa. Ademais, fórmulas infantis PHF1 e PHWF1 mostraram uma capacidade similar de ativar basófilos, o que pode indicar que elas têm um potencial de causar uma reação alérgica semelhante. No entanto, a fórmula PHF2 causou uma ativação menor, sugerindo que fórmulas parcialmente hidrolisadas (com proteínas quebradas em pedaços menores) podem ser mais seguras para pessoas com alergia ao leite de vaca. Isso significa que essas fórmulas têm menos chance de causar uma reação alérgica intensa (Fiocchi *et al.*, 2016; Ansotegui *et al.*, 2020; Matsubara *et al.*, 2023).

O teste de ativação de basófilos mostrou estar associado a reações alérgicas mais graves em pessoas com alergia ao leite, assim como já foi observado com ovos e leite em outros estudos. Também, é útil para distinguir pacientes alérgicos de aqueles que são sensibilizados, mas não têm sintomas. Estudos indicaram que os resultados do TAB podem servir como biomarcadores, ajudando a prever a gravidade ou o limiar das reações alérgicas, tanto para leite quanto para amendoim. Indivíduos com alergia ao leite apresentaram níveis mais altos de sIgE e uma maior proporção de basófilos com expressão de CD63 em comparação aos que não têm a alergia. A anafilaxia ocorreu em 19,2% dos alérgicos ao leite. Foi observada uma correlação significativa entre o nível de sIgE e a quantidade de basófilos ativados em resposta ao leite (Malucelli, Junior, Mello e Prando, 2023; Hee Kim *et al.*, 2020). O CD-sens específico para caseína foi testado em 21 pacientes durante um desafio alimentar controlado (DBPCFC). Foi observada uma forte correlação entre os níveis de CD-sens específico para caseína e os níveis de IgE para leite, com uma correlação ainda mais forte entre o CD-sens e a IgE para caseína. Isso indica que pacientes com maior sensibilização à caseína (CD-sens elevado) tendem a ter níveis mais altos de IgE tanto para leite quanto para caseína. Ainda, o teste de ativação de basófilos foi mais eficaz para identificar a resposta clínica à Alergia à Proteína do Leite de Vaca (APLV). Os resultados mostraram que a atividade dos basófilos, tem relação com a gravidade dos sintomas da alergia. No entanto, a ativação dos basófilos deve ser comparada com a ativação de anti-IgE nos pacientes, para uma avaliação mais completa e precisa (Røisgård *et al.*, 2024; Schocker *et al.*, 2019).

O teste de ativação de basófilos (BAT) é considerado uma ferramenta eficaz para diagnosticar a alergia à proteína do leite de vaca (APLV), pois simula a gravidade das reações alérgicas ao entrar em contato com alérgenos presentes tanto no leite de vaca quanto no leite humano. Além de identificar a alergia, o BAT também é útil para acompanhar a evolução da condição ao longo do tempo. Como é confiável e relativamente econômico, o BAT pode substituir, em muitos casos, os testes mais complexos e arriscados, como o teste duplo-cego controlado por placebo (DOCCP), que envolve a exposição direta ao alérgeno. Assim, conforme os pacientes desenvolvem tolerância clínica ao leite de vaca, ou seja, passam a consumir leite

sem apresentar reações alérgicas, ocorre uma redução na resposta dos basófilos às proteínas do leite. Isso significa que, à medida que o corpo deixa de reagir de forma alérgica, os basófilos se tornam menos ativados quando entram em contato com essas proteínas (Noriega, Teodorowicz, Savelkoul e Rui-nemans-Koerts, 2021; Nucera *et al.*, 2015).

6 CONCLUSÃO

O uso do teste de ativação de basófilos têm se mostrado um eficaz biomarcador para a gravidade e o limiar das reações alérgicas, devendo ser considerado de acordo com a história clínica e outros fatores de risco. O interesse crescente nesse método se dá pelo potencial efeito de imitar o fenótipo clínico de pacientes sensibilizados com sIgE pela ligação cruzada de Fc γ RI com o alérgeno, em contraste com os níveis de IgE específica para alérgenos. Foi significativamente correlacionado com sIgE, e o desempenho aumentado com sIgE foi combinado com o BAT ao testar alergia ao leite. Foi sugerido como alternativa ao TPO para prever a gravidade clínica de reações alérgicas e anafiláticas. É válido frisar também que, ensaios comerciais de basófilos estão disponíveis, mas raramente são completamente validados e consequentemente precisam de investigação adicional antes de serem aplicados convencionalmente. Em conclusão, o BAT pode ser uma ferramenta útil combinada com ferramentas de sensibilização, incluindo testes cutâneos de puntura ou sIgE, para alergia ao leite para aumentar a precisão diagnóstica de AA e reduzir a necessidade de desafios alimentares orais.

7 REFERÊNCIAS

- ABRIL-GIL, M. et al. Desenvolvimento e caracterização de um modelo eficaz de alergia alimentar em ratos brown norway. *Plos um*, v. 10, 2015.
- ADAMS, J. J. et al. Structure of bovine beta-lactoglobulin (variant a) at very low ionic strength. *Journal of structural biology*, v. 154, n. 3, p. 246–254, 2006.
- AGOSTONI, C. et al. The nutritional value of protein-hydrolysed formulae. *Crit rev food sci nutr*, v. 18, 2014.
- ANSOTEGUI, I. J. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a world allergy organization position paper. *The world allergy organization journal*. [s.l.: s.n.].
- BENHAMOU, A. H. et al. An overview of cow's milk allergy in children. *Swiss medical weekly*, 2009.
- BINDSLEV-JENSEN, C. Food allergy. *Bmj (clinical research ed.)*, v. 316, n. 7140, p. 1299–1302, 1998.
- BRICENO NORIEGA, D. et al. The basophil activation test for clinical management of food allergies: recent advances and future directions. *Journal of asthma and allergy*, v. 14, p. 1335–1348, 2021.
- BURKS, A. W. et al. Antibody response to milk proteins in patients with milk-protein intolerance documented by challenge. *The journal of allergy and clinical immunology*, v. 85, n. 5, p. 921–927, 1990.

- CASES, B. et al. Phosphorylation reduces the allergenicity of cow casein in children with selective allergy to goat and sheep milk. *Journal of investigational allergology & clinical immunology: official organ of the international association of asthmology (interasma) and sociedad latinoamericana de alergía e inmunología*, v. 21, n. 5, p. 398–400, 2011.
- CAWThERN, K. M. et al. Interactions of α -lactalbumin with fatty acids and spin label analogs. *The journal of biological chemistry*, v. 272, n. 49, p. 30812–30816, 1997.
- CHABOT, R. Cow's milk allergy. *Journal of the royal society of medicine*, 1951.
- DAMBACHER, w. M. et al. Double-blind placebo-controlled food challenges in children with alleged cow's milk allergy: prevention of unnecessary elimination diets and determination of eliciting doses. *Nutrition journal*, v. 12, n. 1, p. 22, 2013.
- DOCENA, G. H. et al. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy*, v. 51, n. 6, p. 412–416, 1996.
- DONA, D. W.; SUPHIOGLU, C. Egg allergy: diagnosis and immunotherapy. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 14, p. 5010, 2020.
- DUPONT, C. et al. Atopy patch test for early diagnosis of cow's milk allergy in preterm infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, v. 50, n. 4, p. 463–464, 2010.
- EIGENMANN, P. A. The spectrum of cow's milk allergy. *Pediatric allergy and immunology: official publication of the european society of pediatric allergy and immunology*, v. 18, n. 3, p. 265–271, 2007.
- EWING, W. M.; Allen, p. J. The diagnosis and management of cow milk protein intolerance in the primary care setting. *Pediatric nursing*, v. 31, n. 6, p. 486–493, 2005.
- Expression, and mapping of allergenic determinants of κ -casein, a major cow's milk allergen. *Cloning*, [s.d.].
- FARRELL, H. M., Jr et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *Journal of dairy science*, v. 87, n. 6, p. 1641–1674, 2004.
- FIOCCHI, A. Cow's milk allergy: towards an update of dracma guidelines. *The world allergy organization journal*. [s.l.: s.n.].
- FOGOLARI, F. et al. Monomeric bovine beta-lactoglobulin adopts a beta-barrel fold at pH 2. *Febs letters*, v. 436, n. 2, p. 149–154, 1998.
- FOONG, R.-X. et al. Improving diagnostic accuracy in food allergy. *The journal of allergy and clinical immunology in practice*, v. 9, n. 1, p. 71–80, 2021.
- FOONG, R.-X.; SANTOS, A. F. Biomarkers of diagnosis and resolution of food allergy. *Pediatric allergy and immunology: official publication of the european society of pediatric allergy and immunology*, v. 32, n. 2, p. 223–233, 2021.
- GUPTA, R. S. et al. Prevalence and severity of food allergies among us adults. *Jama network open*, v. 2, n. 1, p. E185630, 2019.

- HIRAYAMA, K. et al. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by esims and frit-fab lc/ms. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 173, n. 2, p. 639–646, 1990.
- HOCHWALLNER, H. Cow's milk allergy: from allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods (san diego, calif.)*, v. 66, n. 1. P. 22–33, 2014.
- HOCHWALLNER, H. et al. Cow's milk allergy: from allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods (san diego, calif.)*, v. 66, n. 1, p. 22–33, 2014.
- IWEALA, O. I.; CHOUDHARY, S. K.; COMMINS, S. P. Alergia alimentar. *Curr gastroenterol rep*, v. 20, 2018a.
- IWEALA, O. I.; CHOUDHARY, S. K.; COMMINS, S. P. Food allergy. *Current gastroenterology reports*, v. 20, n. 5, p. 17, 2018b.
- JÄRVINEN, K. M.; SUOMALAINEN, H. Development of cow's milk allergy in breast-fed infants: cow's milk allergy in breast-fed infants. *Clinical and experimental allergy: journal of the british society for allergy and clinical immunology*, v. 31, n. 7, p. 978–987, 2001.
- JÄRVINEN, K.-M. et al. B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. *The journal of allergy and clinical immunology*, v. 110, n. 2, p. 293–297, 2002.
- JENNESS, R. Comparative aspects of milk proteins. *The journal of dairy research*, v. 46, n. 2, p. 197–210, 1979.
- KATTAN, J. D.; Cocco, R. R.; Järvinen, K. M. Milk and soy allergy. *Pediatric clinics of north america*, v. 58, n. 2, p. 407–26, x, 2011.
- KIM, T.-E. et al. Comparison of skin prick test results between crude allergen extracts from foods and commercial allergen extracts in atopic dermatitis by double-blind placebo-controlled food challenge for milk, egg, and soybean. *Yonsei medical journal*, v. 43, n. 5, p. 613–620, 2002.
- KIM, Y. H. et al. Investigation of basophil activation test for diagnosing milk and egg allergy in younger children. *Journal of clinical medicine*, v. 9, n. 12, p. 3942, 2020.
- KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, I. Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *Journal of dairy science*, v. 87, n. 4, p. 785–796, 2004.
- MACGLASHAN, D. W., Jr. Basophil activation testing. *The journal of allergy and clinical immunology*, v. 132, n. 4, p. 777–787, 2013.
- Magnetic resonance studies on the conformational changes related to the foaming properties of b-lactoglobulin. [s.l: s.n.].
- MALUCELLI, M. et al. Biomarkers associated with persistence and severity of ige-mediated food allergies: a systematic review. *Jornal de pediatria*, v. 99, n. 4, p. 315–321, 2023.

- MARCHESSEAU, S. et al. Casein interactions studied by the surface plasmon resonance technique. *Journal of dairy science*, v. 85, n. 11, p. 2711–2721, 2002.
- MATSUBARA, T. et al. Allergenicity of partially hydrolyzed whey and casein formulas evaluated by immunocap inhibition assay and basophil activation test. *Frontiers in allergy*, v. 4, p. 1207924, 2023.
- MATSUO, H.; YOKOOJI, T.; TAOGOSHI, T. Common food allergens and their ige-binding epitopes. *Allergology international: official journal of the japanese society of allergology*, v. 64, n. 4, p. 332–343, 2015.
- MCGEE, H. *Milk and dairy products. Em: on food and cooking: the science and lore of the kitchen*. New york: scribner, 2004. P. 7–67.
- METZ, M. et al. Frequency and clinical implications of skin autoreactivity to serum versus plasma in patients with chronic urticaria. *The journal of allergy and clinical immunology*, v. 123, n. 3, p. 705–706, 2009.
- MORRIS, B. The components of the wired spanning forest are recurrent. *Probability theory and related fields*, v. 125, n. 2, p. 259–265, 2003.
- MOSSBERG, A.-K. et al. Structure and function of human α -lactalbumin made lethal to tumor cells (hamlet)-type complexes: structure and function of hamlet-type complexes. *The febs journal*, v. 277, n. 22, p. 4614–4625, 2010.
- MURARO, A. et al. Diretrizes de alergia alimentar e anafilaxia da eaaci. Primário prevenção de alergia alimentar. *Alergia*, v. 69, 2014.
- MUTHUKUMAR, J. et al. Food and food products associated with food allergy and food intolerance - an overview. *Food research international (ottawa, ont.)*, v. 138, n. Pt b, p. 109780, 2020.
- NAMAZOVA-BARANOVA, I. Food allergy and food intolerance - new developments. *Global pediatrics*, v. 9. [s.l: s.n.].
- NIGGEMANN, B. When is an oral food challenge positive?: when is an oral food challenge positive? *Allergy*, v. 65, n. 1, p. 2–6, 2010.
- NUCERA, E. et al. Utility of basophil activation test for monitoring the acquisition of clinical tolerance after oral desensitization to cow's milk: pilot study. *United european gastroenterology journal*, v. 3, n. 3, p. 272–276, 2015.
- PELTO, I. et al. Milk hypersensitivity in young adults. *European journal of clinical nutrition*, v. 53, n. 8, p. 620–624, 1999.
- RESTANI, P. et al. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 395, n. 1, p. 47–56, 2009.
- RØISGÅRD, S. et al. Basophil allergen threshold sensitivity to casein (casein-specific cd-sens) predicts allergic reactions at a milk challenge in most but not all patients. *Immunity, inflammation and disease*, v. 12, n. 5, p. E1265, 2024.
- RUBIO, A. et al. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children: basophil activation test in cow's milk allergy. *Allergy*, v. 66, n. 1, p. 92–100, 2011.

- RUINEMANS-KOERTS, J. et al. The basophil activation test reduces the need for a food challenge test in children suspected of ige-mediated cow's milk allergy. *Clinical and experimental allergy: journal of the british society for allergy and clinical immunology*, v. 49, n. 3, p. 350–356, 2019.
- SAMPSON, H. A. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *The journal of allergy and clinical immunology*, v. 103, n. 5, p. 717–728, 1999.
- SAMPSON, H. A. Update on food allergy. *The journal of allergy and clinical immunology*, v. 113, n. 5, p. 805–19; quiz 820, 2004.
- SAVILAHTI, E. Cow's milk allergy. *Allergy*, v. 36, n. 2, p. 73–88, 1981.
- SCHOCKER, F. et al. Individual sensitization pattern recognition to cow's milk and human milk differs for various clinical manifestations of milk allergy. *Nutrients*, v. 11, n. 6, p. 1331, 2019.
- SHEK, I. P. C. et al. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced ige-mediated and non-ige-mediated disorders. *Allergy*, v. 60, n. 7, p. 912–919, 2005.
- SICHERER, S. H.; LEUNG, D. Y. M. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects. *The journal of allergy and clinical immunology*, v. 118, n. 1, p. 170–177, 2006.
- SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Alergia alimentar: uma revisão e atualização sobre epidemiologia, patogênese, diagnóstico, prevenção e manejo. *J allergy clin immunol*, v. 141, 2018.
- SID IDRIS, F. et al. Maternal diet and infant risk of eczema and food allergy: a systematic review. *Cureus*, v. 15, n. 9, p. E45114, 2023.
- SKRIPAK, J. M. et al. The natural history of ige-mediated cow's milk allergy. *The journal of allergy and clinical immunology*, v. 120, n. 5, p. 1172–1177, 2007.
- SPUERGIN, P. et al. Allergenicity of alpha-caseins from cow, sheep, and goat. *Allergy*, v. 52, n. 3, p. 293–298, 1997.
- STANIC, D. et al. Cirkovic velickovic, mol. *Mol. Nutr. food res*, v. 54, p. 1273–1284, 2010.
- TSABOURI, S.; DOUROS, K.; PRIFTIS, K. N. Cow's milk allergenicity. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, v. 14, n. 1, p. 16–26, 2014.
- UHRÍNOVÁ, S. et al. Structural changes accompanying ph-induced dissociation of the beta-lactoglobulin dimer. *Biochemistry*, v. 39, n. 13, p. 3565–3574, 2000.
- VILA, L. et al. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clinical and experimental allergy: journal of the british society for allergy and clinical immunology*, v. 31, n. 10, p. 1599–1606, 2001.
- WAL, J. M. et al. Cow's milk allergy: the humoral immune response to eight purified allergens. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 371b, p. 879–881, 1995.

- WAL, J.-M. Cow's milk proteins/allergens. *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the american college of allergy, asthma, & immunology*, v. 89, n. 6 suppl 1, p. 3–10, 2002.
- WAL, J.-M. Bovine milk allergenicity. *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the american college of allergy, asthma, & immunology*, v. 93, n. 5, p. S2–s11, 2004.
- YU, W.; FREELAND, D. M.; NADEAU, K. C. Alergia alimentar: mecanismos imunológicos, diagnóstico e imunoterapia. *Nat rev immunol*, v. 16, p. 75165–75168, 2016.

8 ANEXOS

ANEXO I – MODELO DO MANUSCRITO PARA SUBMISSÃO E PUBLICAÇÃO

Título em português

Subtítulo em português (Calibri Light, tamanho 16)

Autor UM³Endereço ORCID fazer cadastro em: <https://orcid.org/>Autor DOIS⁴Endereço ORCID fazer cadastro em: <https://orcid.org/>**RESUMO** (Calibri corpo, tamanho 11)

Elaborar um resumo informativo em inglês contendo de **100 a 500 palavras**, baseando-se na norma NBR6028, mantendo a estrutura das seções aqui colocadas em negrito. O resumo deve ter **Introdução** seguido de **Objetivo, Metodologia, Resultados e Conclusão**. A configuração do texto: Tahoma 10, justificado, espaçamento simples.

Palavras-chave

História do Brasil; Tipografia; Brasil – Império; Dom Pedro II. (até 5 termos – apenas a primeira em maiúsculo)

Título em inglês

Subtítulo em inglês (Calibri Light, tamanho 16)

ABSTRACT (Calibri corpo, tamanho 11)

Elaborar um resumo informativo em inglês contendo de **100 a 500 palavras**, baseando-se na norma NBR6028, mantendo a estrutura das seções aqui colocadas em negrito. O resumo deve ter **Introdução** seguido de **Objetivo, Metodologia, Resultados e Conclusão**. A configuração do texto: Tahoma 10, justificado, espaçamento simples.

³ Ocupação/formação, instituição a qual esteja ligado, Estado e endereço eletrônico.

⁴ Ocupação/formação, instituição a qual esteja ligado, Estado e endereço eletrônico.

Keywords

History of Brazil; Typography; Brazil – Empire; Dom Pedro II. (até 5 termos – apenas a primeira em maiúsculo)

Submetido em: XX/XX/2024 – Aprovado em: XX/XX/2024 – Publicado em: XX/XX/2024

1 INTRODUÇÃO (Calibri Light, Negrito 14 pts, cor verde escuro)

Texto Calibri (Corpo), 12. Os cabeçalhos das seções/subdivisões devem ser breves e claros. O texto do artigo deve ser estruturado preferencialmente contemplando os seguintes itens: introdução, método, resultados e conclusão. Acrônimos e abreviações devem estar entre parênteses e serem precedidos de seu significado completo quando do primeiro uso no texto.

Configuração do texto: **Calibri (Corpo) 12**, justificado, **espaçamento 1,15 (múltiplos)**, com recuo na **1ª linha dos parágrafos (1,5)**. *Palavras estrangeiras devem ser grafadas em itálico. Para ênfase ou destaque usar negrito, ‘aspas simples’ ou “aspas duplas”.*

Exemplo de paráfrase cuja autoria da fonte é parte do texto: De acordo com Silva (2005) lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt. Suspendisse aliquam venenatis ipsum.

Exemplo de paráfrase cuja autoria da fonte não é parte do texto: lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt. Suspendisse aliquam venenatis ipsum (SILVA, 2005).

No caso de citações diretas curtas (até 3 linhas), as mesmas devem ser colocadas entre aspas duplas “lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt”, sendo antecedida ou seguida da indicação da fonte, conforme as regras acima, adicionando-se, ainda, a(s) página(s) das quais foram retiradas.

No caso de citações longas (mais de três linhas), este é o exemplo. Configuração do texto: Calibri (Corpo) 11, justificado, espaçamento simples, com recuo de 4 cm no parágrafo inteiro. Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt. (SILVA, 2005, p. 44)

Outro exemplo que em que o autor precede a citação direta longa. De acordo com Moraes (2005, p. 44),

configuração do texto: fonte **Calibri (Corpo)**, 11 pts., justificado, espaçamento simples, recuo de 4 cm para todo o parágrafo lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut

vulputate tincidunt turpis at tincidunt lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt

Nunca termine uma seção com citação longa. Procure continuar com o texto de forma a estabelecer uma ligação com o item/seção seguinte lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.

1.1 Seção Secundária (Calibri Light, Itálico, 12 pts, cor verde escuro)

Configuração do texto: Calibri (Corpo) 12, justificado, espaçamento 1,15, com recuo na 1ª linha dos parágrafos. *Palavras estrangeiras devem ser grafadas em itálico.* **Para ênfase ou destaque usar negrito**, ‘aspas simples’ ou “aspas duplas”.

[exemplo de parágrafo subdividido] lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt:

- a) alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível;
- alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível;
- alínea de segundo nível;
- b) alínea de primeiro nível.

Nunca termine uma seção com alíneas. Procure continuar com o texto de forma a estabelecer uma ligação com o item/seção seguinte lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt

1.2 Seção Terciária (Calibri Light, Itálico, 12 pts, cor verde-escuro)

Configuração do texto: Calibri (Corpo) 12, justificado, espaçamento 1,15, com recuo na 1ª linha dos parágrafos (1,5). *Palavras estrangeiras devem ser grafadas em itálico.* **Para ênfase ou destaque usar negrito**, ‘aspas simples’ ou “aspas duplas”.

Ilustrações (figuras, gráficos e quadros) deverão ser incorporadas ao texto e depositadas como documentos suplementares no formato tiff ou jpg (300 dpis) caso esteja muito grande no corpo do texto durante o salvamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Configuração do texto: Calibri (Corpo) 12, justificado, espaçamento 1,15, com recuo na 1ª linha dos parágrafos (1,5). *Palavras estrangeiras devem ser grafadas em itálico.* **Para ênfase ou destaque usar negrito**, ‘aspas simples’ ou “aspas duplas”.

[exemplo de parágrafo subdividido] lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt:

- a) alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível;
- alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível;
- alínea de segundo nível;
- b) alínea de primeiro nível.

Nunca termine uma seção com alíneas. Procure continuar com o texto de forma a estabelecer uma ligação com o item/seção seguinte lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt

3 METODOLOGIA

Indicar qual o tipo de pesquisa, como o estudo foi delineado e a amostra selecionada, qual a forma de coleta de dados, qual análise foi planejada para alcançar o objetivo da pesquisa e quais aspectos éticos foram envolvidos.

Configuração do texto: Calibri (Corpo) 12, justificado, espaçamento 1,15, com recuo na 1ª linha dos parágrafos (1,5). Palavras estrangeiras devem ser grafadas em itálico. Para ênfase ou destaque usar negrito, ‘aspas simples’ ou “aspas duplas” .

[exemplo de parágrafo subdividido] lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt:

- a) alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível;
- alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível;
- alínea de segundo nível;
- b) alínea de primeiro nível.

Nunca termine uma seção com alíneas. Procure continuar com o texto de forma a estabelecer uma ligação com o item/seção seguinte lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt

4 RESULTADOS (Calibri Light, Negrito 14 pts, cor verde)

São apontados nessa seção, os resultados, os achados da investigação acompanhados, se aplicável, da respectiva análise estatística. (Texto tamanho 12, Times New Roman)

Figura 1. Título da figura {tamanho 11}



Fonte: [fonte dos dados ex: o(s) autor(es), pesquisa de campo] {Tamanho 10}

5 DISCUSSÃO (Calibri Light, Negrito 14 pts, cor verde)

Discussão: o que os achados significam? Interpretação dos resultados. Caso apresente o resultado e nele já faça as interpretações, não há necessidade dessa seção.

Configuração do texto: Calibri corpo 12, justificado, espaçamento 1,15, com recuo na 1ª linha dos parágrafos. Palavras estrangeiras devem ser grafadas em itálico. Para ênfase ou destaque usar negrito, ‘aspas simples’ ou “aspas duplas”.

[exemplo de parágrafo subdividido] lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt:

- a) alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível;
- alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível;
- alínea de segundo nível;

b) alínea de primeiro nível.

Nunca termine uma seção com alíneas. Procure continuar com o texto de forma a estabelecer uma ligação com o item/seção seguinte lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt

Tabela 1 - Título da tabela (Para tradução em inglês usar **Table** – Usar essas cores para formatar) - {Tamanho 11}

Faixa etária	Nº	%
11-20 anos	5	2,4
21-30 anos	14	13,6
31-40 anos	96	84
Total	115	100,0

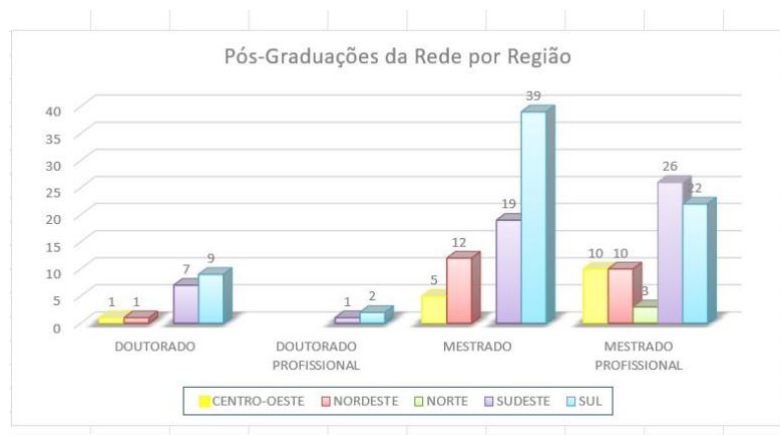
Fonte: [fonte dos dados ex: o(s) autor(es), pesquisa de campo] {Tamanho 10}

Quadro 1 - Título do quadro (Para tradução em inglês usar **Frame** – Usar essas cores para formatar) - {Tamanho 11}

Ordem	Local	Percentual distribuído	Descritivo
01	Fortaleza, CE	20%	Não há áreas afetadas, mas possui grande risco de entrada de novos....
02	Tianguá, CE	15%	Não há áreas afetadas, mas possui grande risco de entrada de novos....
03	Sobral, CE	5%	Não há áreas afetadas, mas possui grande risco de entrada de novos....

Fonte: [fonte dos dados ex: o(s) autor(es), pesquisa de campo]

Gráfico 1 - Título do gráfico (Para tradução em inglês usar **Chart**) - {Tamanho 11}



Fonte: [fonte dos dados ex: o(s) autor(es), pesquisa de campo]

Nunca termine uma seção com ilustrações ou tabelas. Procure continuar com o texto de forma a estabelecer uma ligação com o item/seção seguinte Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt.

6 CONCLUSÃO

Usar O termo **CONCLUSÃO** ao fechar o texto, e **NÃO usar CONSIDERAÇÕES FINAIS**. Ser mais objetivo e preciso ao fechar a Conclusão do artigo. Seguir a mesma estrutura do RESUMO ESTRUTURADO.

Configuração do texto: Calibri corpo 12, justificado, espaçamento 1,15, com recuo na 1ª linha dos parágrafos (1,5). *Palavras estrangeiras devem ser grafadas em itálico*. **Para ênfase ou destaque usar negrito**, ‘aspas simples’ ou “aspas duplas”.

[exemplo de parágrafo subdividido] Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt:

- a) alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível alínea de primeiro nível;
- alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível alínea de segundo nível,
- alínea de segundo nível;
- b) alínea de primeiro nível.

Nunca termine uma seção com alíneas. Procure continuar com o texto de forma a estabelecer uma ligação com o item/seção seguinte Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur

adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut vulputate tincidunt turpis at tincidunt.

REFERÊNCIAS (Calibri Light, Negrito, 14pts, cor verde)

- Configuração do texto: Calibri corpo 12, alinhamento à esquerda, espaçamento simples, com 6pt antes e 0pt depois entre os parágrafos de cada referência. **[NÃO JUSTIFICAR]**.
- Caso haja mais de uma obra do mesmo autor, citar respeitando a ordem cronológica de publicação; caso haja mais de uma obra do mesmo autor publicada no mesmo ano, diferenciá-las por meio de a, b e c. As referências devem incluir apenas os trabalhos efetivamente utilizados para a elaboração do artigo.
- Obs.: **Obrigatório o Nome dos autores por abreviados nas referências.**
- Repetir os autores **não usar traço/ponto**: (_____.)
- Ative todas as URL's – muito longa a URL, use o encurtador de URL Bitly> <https://bitly.com/>.
- Não usar URL de Redes Acadêmicas como ResearchGate e Academia.edu. Encurtá-las pelo Bitly.

- Exemplos de Referências e Citações:

1) Livros:

SOBRENOME DO AUTOR, Nome do autor. **Título do livro** (em negrito, somente a primeira letra em maiúscula): subtítulo (sem negrito). Edição. Local: Editora, data. v. (Série ou Coleção).

Ex.:

- DUPAS, G. **Ética e poder na sociedade da informação**: de como a autonomia das novas tecnologias obriga a rever o mito do progresso. 3. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2011.

Citação INDIRETA no texto: Dupas (2011) ou no final da citação (DUPAS, 2011).

Citação DIRETA no texto: Dupas (2011, p. 12) ou no final da citação (DUPAS, 2011, p. 12).

2) Capítulos de livro:

SOBRENOME DO AUTOR, Nome do autor. Título do capítulo sem destaque. *In*: seguida das referências do livro: SOBRENOME DO AUTOR, Nome de autor. **Título do livro** (em negrito, somente a primeira letra em maiúscula): subtítulo (em negrito). Edição. Local: editora, data, número das p. (páginas consultadas) ou v. (Série ou Coleção).

Ex.:

- RIBEIRO, C. M. Biblioteca digital. *In*: SANTOS, G. C. **Acrônimos, siglas e termos técnicos**: arquivística, biblioteconomia, documentação, informática. 2. ed. rev. e ampl. Campinas, SP: Átomo, 2012. 289 p. (Série Dicionários).

Citação INDIRETA no texto: Ribeiro (2012) ou no final da citação (RIBEIRO, 2012).

Citação DIRETA no texto: Ribeiro (2012, p. 102) ou no final da citação (RIBEIRO, 2012, p. 102).

3) Trabalhos publicados em anais de eventos ou similares:

- SOBRENOME DO AUTOR, Nome do autor. Título: subtítulo. *In*: NOME DO EVENTO (em negrito e maiúsculo), número, ano, local de realização. **Título da publicação seguindo de reticências entre colchetes** (em negrito). Local de publicação (cidade): Editora, data, páginas inicial-final do trabalho.

Ex.:

ZUBEN, A. V.; CASANOVA, C. Vigilância epidemiológica da leishmaniose visceral americana (LVA) em cães no município de Campinas, São Paulo. *In*: REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇAS DE CHAGAS, 26.; REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM LEISHMANIOSES, 14., 2010, Uberaba. **Anais [...]**. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2010. p. 135-175.

Citação no texto: Zuben e Casanova (2010) ou no final da citação (ZUBEN; CASANOVA, 2010).

4) Partes de publicações periódicas

4.1) Artigos de periódicos:

SOBRENOME DO AUTOR, Nome do autor. Título do artigo (sem destaque). **Nome do periódico** (em negrito), cidade, volume e número do periódico, páginas, data de publicação.

Ex.:

SILVA, J. A. T. The Matthew effect impacts science and academic publishing by preferentially amplifying citations, metrics and status. **Scientometrics**, Budapest, v.126, n.6, p.5373–5377, 2021.

Citação no texto: Silva (2021) ou no final da citação (SILVA, 2021).

4.2) Artigos de jornal:

SOBRENOME DO AUTOR, Nome do autor. Título do artigo. **Título do jornal**. Número ou título do caderno, seção ou suplemento, Local, páginas inicial-final, dia, mês, ano.

Ex.:

- BRITO, A. As relíquias dos sebos de Campinas: pontos de venda de livros usados sobrevivem ao domínio das megastores e oferecem um acervo que faz invejas às bibliotecas. **Gazeta Mercantil**, São Paulo, 6 ago.1999.

Citação no texto: Brito (1999) ou no final da citação (BRITO, 1999).

5) Monografias, dissertações e teses:

SOBRENOME DO AUTOR, Nome do autor. **Título** (em negrito): subtítulo. ano, número de folhas ou volumes. (Categoria e área de concentração) - Nome da Faculdade, Nome da Universidade, cidade.

Ex.:

- SANTOS, G. C. **Estudo da interlocução entre biblioteca-escola-tecnologia, baseada na Internet**: um estudo de caso na Escola Estadual Sergio Pereira Porto. 2002. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Educação, Campinas, SP.

Citação no texto: Santos (2002) ou no final da citação (SANTOS, 2002).

6) Publicações online:

SOBRENOME DO AUTOR, Nome do autor. Título do artigo. **Nome do periódico**. Cidade, volume do periódico, número do periódico, número de páginas, ano. ISSN. Disponível em: endereço eletrônico. Acesso em: dia/mês/ano. DOI (quando for o caso).

Ex.:

ALEXANDRESCU, D. T. Melanoma costs: a dynamic model comparing estimated overall costs of various clinical stages. **Dermatology Online Journal**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 1, nov. 2009. Disponível em: http://dermatology.cdlib.org/1511/originals/melanoma_costs/alexandrescu.html. Acesso em: 3 nov. 2009.

Citação no texto: Alexandrescu (2009) ou no final da citação (ALEXANDRESCU, 2009).

- REVISTA CIENTÍFICA SEMANA ACADÊMICA. Fortaleza: UniEducar, 2011- . ISSN 2236-6717. Mensal. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/rdbci> <https://semanaacademica.org.br/>. Acesso em: 16 fev. 2023.

Citação no texto: REVISTA CIENTÍFICA SEMANA ACADÊMICA (2023) ou no final da citação (REVISTA CIENTÍFICA SEMANA ACADÊMICA, 2023).

Para outros exemplos recomendamos consultar as normas da ABNT-NBR-6023/2018. Para os usuários de sistemas eletrônicos de indexação de referências (Mendeley, EndNote, Zotero ou outro), adotar como padrão o estilo ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas para normalizar as referências.

As citações, quando diretas, deverão acompanhar a respectiva paginação.

Lembrando novamente:

- 1) Nomes dos autores abreviados;
- 2) Todas as URLs (endereço do artigo) ativos
- 3) Após o título do periódico incluir a cidade. Usar a expressão [S./] somente se não encontrar, de acordo com a [NBR 6023/2018](#). Procure a localização do periódico no [Portal do ISSN](#), [ROAD](#) e [DOAJ](#), ou até mesmo no [CCN](#).

A não observância desses pontos, o manuscrito será devolvido para correções antes do processo de avaliação.

**OS APÊNDICES E/OU ANEXOS DEVEM SER INCLUÍDOS DENTRO DO ARTIGO.
INCLUÍ-LOS NO FINAL DO MANUSCRITO APÓS AS REFERÊNCIAS.**