

Alergia ao leite de vaca: mecanismo, diagnóstico e perspectivas biotecnológicas

Allergy to cow's milk: mechanism, diagnosis and biotechnological perspectives

Recebido em: 17/09/2017

Aceito em: 16/02/2018

Rodrigo de Lima ROCHA

Universidade Estadual de Maringá-PR. Av. Colombo, 5790 – Zona 7, Cep 87020-900. Maringá, PR, Brasil. E-mail: r.limarochoa@hotmail.com

ABSTRACT

The frequency of cow's milk allergy patients has become alarming. Recent epidemiological reports have shown that one of the most worrying reasons for the occurrence of this type of allergy is the presence of beta-lactoglobulin in milk. Health problems include hypersensitization of the immune system, gastrointestinal, cutaneous, respiratory problems, and, when more severe, anaphylactic events occur. In the present work, we studied the allergenicity to cow's milk about the mechanisms involved in the sensitization of the immunological system, diagnostics and biotechnological perspectives, through the analysis of 52 articles associated with this problematization. The results of the analysis based on allergenicity to cow's milk revealed the existence of a diversity of nonspecific symptoms that corroborate the retardation of the diagnosis. Also, it was possible to perceive that most diagnostic protocols are strictly based on the restriction of milk and its derivatives. Despite the difficulties for the correct diagnosis and effective treatment, many studies are still under development using technologies aimed at correcting the hypersensitivity of the immune system caused by milk allergens, editing / interfering gene transcription and, consequently, altering the translation. In this sense, such processes may contribute to the reduction and/or elimination of allergenicity to cow's milk in the daily life of those with this condition.

Key words: food allergy; β -lactoglobulin; immunoglobulins; biotechnology

RESUMO

A frequência dos portadores de alergia ao leite de vaca tem-se tornado alarmante. Relatórios epidemiológicos recentes demonstraram que um dos motivos mais preocupantes para ocorrência desse tipo de alergia é a presença da beta-lactoglobulina no leite. Os agravos a saúde incluem hipersensibilização do sistema imunológico, problemas gastrointestinais, cutâneos, respiratórios, e quando mais graves, surgem os eventos anafiláticos. No presente trabalho estudamos a alergenicidade ao leite de vaca frente aos mecanismos envolvidos na sensibilização dos sistema imunológico, diagnósticos e perspectivas biotecnológicas, através da análise de 52 artigos associados a essa problematização. Os resultados da análise baseados na alergenicidade ao leite de vaca revelaram a existência de uma diversidade de sintomas inespecíficos que corroboram no retardamento do diagnóstico. Além disso, foi possível perceber que a maioria dos protocolos de diagnósticos baseam-se estritamente na restrição do leite e seus derivados. Apesar das dificuldades enfrentadas no diagnóstico correto e tratamento eficaz, muitos estudos seguem em desenvolvimento utilizando tecnologias visando a correção da hipersensibilização do sistema imunológico provocada pelos alérgenos do leite, edição/interferência da transcrição gênica e, conseqüentemente, alterando a tradução. Nesse sentido, tais processos poderão contribuir para redução e/ou eliminação da alergenicidade ao leite de vaca no cotidiano dos portadores dessa condição.

Palavras-chave: alergia alimentar; β -lactoglobulina; imunoglobulinas; biotecnologias.

INTRODUÇÃO

Alergia alimentar (AL) tornou-se o foco de muitos estudos ao redor do mundo, dada a questão do aumento no número de novos casos principalmente em países desenvolvidos (1-3). A prevalência da doença é de aproximadamente 2 a 3% da população geral (4). Sabe-se que esse tipo de agravo afeta crianças e adultos em diferentes fases da vida, promovendo déficit na qualidade de vida. Ademais, os agravos relacionados à AL devem ser considerados graves e jamais subestimados, uma vez que pode causar danos irreversíveis em decorrência das complicações não tratadas (5).

No contexto das reações alérgicas provocadas pela ingestão de alimentos, estas podem ser classificadas como tóxicas e não tóxicas. As reações tóxicas se manifestam pela ação de toxinas bacterianas, efeitos farmacológicos ou tóxicos do próprio alimento. As reações não tóxicas são decorrentes da intolerância alimentar não-imune (como exemplo, a lactose) e alergia alimentar. O que acontece nesses casos é o surgimento de um quadro de hipersensibilidade aos alimentos, com participação de mecanismos imunológicos (6).

Reconhecidamente, as doenças alérgicas passaram a ser entendidas como um problema de saúde pública a nível mundial, agrupadas como doenças crônicas não transmissíveis, que afetam 30% da população (7,8). Por outro lado, o perfil de alérgenos alimentares enfrenta dificuldades no que se refere à diferenciação entre reações adversas e verdadeiras alergias (9).

Quanto à gravidade das AL, os sintomas podem se manifestar de forma leve ou potencialmente fatal; nesse último caso, predominantemente em crianças. Outro fator que merece atenção, é que esse tipo de alergia não apresenta sintoma específico e, dessa forma, o tipo de manifestação clínica é totalmente dependente do tipo de mecanismo imunológico envolvido (10).

Deve ser considerado que na AL os mecanismos são desencadeados majoritariamente pelas imunoglobulinas da classe IgE, sendo mais comuns em crianças do que em adultos (11). Abordagens sobre alergia alimentar, em especial a causada por leite de vaca, têm demonstrado que o diagnóstico se baseia na resposta à exclusão e provocação oral posterior do leite e seus derivados (12). Considerando as características clínicas, alguns estudos demonstraram que as manifestações clínicas aparecem comumente no primeiro ano de vida (13,14).

Nesse sentido, três motivações surgiram para o desenvolvimento dessa pesquisa: o valor clínico dado à APLV (alergia às proteínas do leite de vaca), a importância do diagnóstico como forma de prevenção dos agravos à saúde, e a biotecnologia como ferramenta de correção. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi descrever a importância da alergia ao leite de vaca, retratando seu mecanismo, diagnóstico e perspectivas biotecnológicas.

MÉTODOS

O estudo trata-se de uma revisão narrativa realizada com base em periódicos nacionais e internacionais abordando assuntos relacionados ao tema. As bases consultadas para esta produção foram: Bireme, LILACS, SciELO, Pubmed e portal de periódicos CAPES.

As buscas nas bases de dados nacionais foram realizadas utilizando os unitermos “alergia alimentar” ou “alergia ao leite de vaca” e “beta-lactoglobulina”. Para as buscas internacionais: “food allergy” ou “allergy to cow’s milk” e “beta-lactoglobulin”.

A pesquisa bibliográfica foi realizada para alcançar as melhores evidências sobre alergia alimentar provocada pela ingestão das proteínas do leite de vaca. Para isso, não houve restrições de data e idioma de publicação. Foram selecionados para o estudo, um total de 52 artigos disponíveis nos diferentes bancos de dados supracitados em fevereiro de 2017.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alergia às proteínas do leite de vaca. Relatos da literatura mostraram que as AL têm crescido consideravelmente nos últimos anos ao redor do mundo. Este fato torna-se mais preocupante quando as reações alérgicas se apresentam na sua forma mais grave (2,3,15).

O conhecimento da alergia provocada por leite de vaca tornou-se notório a partir do ano 2000 e consigo o conhecimento de que esse tipo de reação estaria surgindo nos primeiros anos de vida (15). Foi relatado que 21% das crianças com alergia ao leite permaneciam nesta condição até pelo menos 16 anos de idade (16).

Sabe-se que a alergia provocada pelas proteínas do leite de vaca corresponde à reação de hipersensibilidade desencadeada pelo sistema imunológico. E esse fator é bastante agravante, pois, muitas vezes, o leite é o pri-

meio alimento ingerido pelas crianças, causando alergia antes dos 6 meses de idade (17,18). Quanto à gravidade dessa enfermidade, em indivíduos adultos as reações adversas provocadas pelos alimentos não causam risco de vida (19).

As reações provocadas por proteínas do leite da vaca são normalmente mediadas pela produção de linfócitos Th2, com expressiva produção de interleucinas (ILs) 4, 5 e 13. Em contrapartida, células T reguladoras suprimem a função de linfócitos Th2, impedindo que a reação alérgica ocorra. Por outro lado, a interleucina 10 é a principal citocina da resposta inflamatória, que age induzindo a resposta das células T contra os alérgenos (4).

Os anticorpos de imunoglobulina G para os alérgenos do leite são estimulados tanto em crianças atópicas como não-atópicas. Os sintomas alérgicos e a sensibilização atópica estariam associados aos anticorpos IgG4 específicos dos alérgenos. Tanto IgG4 como IgE são regulados por mecanismos semelhantes, e no final da resposta, esses mediadores mudam de classe a partir da interleucina 4 secretada pelos linfócitos Th2. Em contraste, a interleucina 10 inibe a produção de IgE embora regule a secreção de IgG4 (4).

A exclusão total do leite e de seus derivados deve ser avaliada com bastante cautela, uma vez que este tipo de restrição dietética pode acarretar em problemas nutricionais importantes (20). Em adição, pode-se dizer que as deficiências nutricionais prejudicam o crescimento (21). Por essa razão, torna-se necessário o desenvolvimento de novos alimentos funcionais adaptados aos consumidores alérgicos, uma vez que alergia ao leite de vaca trata-se de uma reação imunológica adversa (22).

Proteínas lácteas. Até o momento, várias proteínas foram identificadas como alérgenos do leite, sendo elas: α_{-s1} , α_{-s2} , β e k-caseínas, β -lactoglobulina (β -LG) e α -lactalbumina. As caseínas, β -LG e α -lactalbumina são consideradas os peptídeos de maior alergenidade presente no leite de vaca (23).

A β -LG é, dentre as proteínas do soro do leite, a de maior concentração, correspondendo a 50% do total de todas as proteínas encontradas no soro (24). Esta proteína é um importante alérgeno que estimula a produção de IgE em mais de 90% dos pacientes alérgicos ao leite (23).

Existem evidências de que as proteínas alimentares possuem alta resistência às alterações estruturais provocadas pelo calor, baixo pH e hidrólise por enzimas do fluido gástrico. Dada essas características, aumentam as

chances de chegar à mucosa intestinal para serem absorvidas e ativar a resposta imune. Sendo assim, são esses os fatores que corroboram para o surgimento da alergia às proteínas do leite (23).

Muitos estudos estão voltados para reduzir a alergenidade da β -LG por meio de tratamento térmico, hidrólise enzimática e glicosilação, na modificação de sua estrutura e destruição dos seus epítopos (25,26). Essas ações individuais ou em conjunto são responsáveis por destruir a estrutura tridimensional da β -LG, fazendo com que a mesma torne-se inativa em suas funções fisiológicas. Outra forma de impedir sua função é realizar mutações recombinantes, por meio de mudanças nos resíduos de aminoácidos específicos nos locais de ligações do alérgeno, o que irá implicar em solução para imunoterapia nos casos de alergenidade específica (27).

Sintomatologia. Os sintomas da alergia ao leite de vaca são diversos e por essa razão o diagnóstico por muitas vezes é falho, como exemplo, diagnosticar erroneamente a alergia às proteínas do leite como intolerância a lactose. Dentre os sintomas estão manifestações gastrointestinais e cutâneas, problemas respiratórios e eventos anafiláticos, sendo este último o mais grave e emergencial (18).

Dentre as manifestações clínicas gastrointestinais causadas pela alergia a proteínas do leite podem ser citadas dores abdominais, perda de apetite, doença de refluxo gastroesofágico, sangue nas fezes, diarreia e constipação (22).

Nos pacientes submetidos a dessensibilização oral, as reações adversas ocorrem geralmente com sintomas locais, como é o caso do prurido oral tendo seu efeito ligeiramente cessado, desmerecendo o tratamento com anti-histamínico. As dores abdominais por sua vez, são mais intensas e tornam-se muitas vezes a causa do abandono do tratamento (28).

Como pode ser visto, essas enfermidades implicam diretamente na saúde e qualidade de vida do paciente. Acredita-se que as doenças causadas por APLV são consequência de predisposição genética (12).

Além do que foi dito, é necessário direcionar maior atenção às crianças e aos jovens, visto que esses são passíveis de reações alérgicas mais graves (29-31). Sendo assim, surge a necessidade de maior consciência sobre alergia alimentar (32).

Protocolos de diagnóstico e terapias. Embora existam muitas ferramentas para o diagnóstico da alergia ao leite de vaca, esta condição enfrenta, em boa parte dos casos, várias complexidades. O diagnóstico é reali-

zado por meio de testes cutâneos, pesquisa de anticorpos específicos (IgE) e testes de provocação do próprio alimento. É importante destacar que tais diagnósticos são imprescindíveis, uma vez que irão servir para o direcionamento da conduta médica e, por conseguinte, melhoria na qualidade de vida da criança ou do adulto portadores desta enfermidade (18).

Os testes cutâneos são capazes de reportar a sensibilização e não a alergia propriamente dita. Outros exames complementares como a endoscopia, a biópsia digestiva e a pesquisa de sangue oculto nas fezes são frequentemente solicitados; entretanto, até o momento é desconhecido seu papel para elucidar o diagnóstico, uma vez que se trata de exames inespecíficos para investigação de alergia alimentar. Além disso, esses procedimentos são bastante criticados quando realizados em pacientes com bom estado de saúde, visto que é pouco provável sua contribuição para o diagnóstico de APLV (1).

Para o tratamento sintomático do episódio agudo da alergia, pode-se contar com auto-injetor de epinefrina nos casos de anafilaxia, em caráter de emergência (29). Por outro lado, as imunoterapias não são um tratamento de emergência, mas sim utilizadas para controle e evitar a progressão da doença. Na imunoterapia, o que se tem é a mistura de um alimento alergênico a outro diariamente consumido, sendo essa preparação consumida gradativamente em doses crescentes, e que pode ser realizada com variação de alimentos desde que suas proteínas sejam identificadas previamente e que estejam isentos de contaminação microbiana (33).

Os mecanismos da imunoterapia oral ainda não foram totalmente elucidados. Tudo do que tem sido realizado indica que há ativação da resposta imunitária com aumento da IgG4, uma vez que é descrita como neutralizante do antígeno (34, 35). Sendo assim, existem poucas evidências de que realmente este tipo de terapia conceda tolerância duradoura aos alimentos (33).

Outro método de indução à tolerância de um alimento alergênico é o teste de imunoterapia sublingual, que é realizado com a oferta de doses gradativas do extrato do alimento alergênico sob a língua. Apesar deste método ser capaz de promover tolerância a certos alimentos, tem sido documentado que a imunoterapia oral reporta mais eficiência e segurança no desenvolvimento de tolerância alimentar (19, 36, 37).

Acredita-se que crianças com níveis elevados de IgE sejam mais propensas a adquirir APLV de modo persistente (38). Em contrapartida, em crianças com níveis decrescentes de IgE pode-se prever que estejam mais

próximas da recuperação (39). Por outro lado, por mais que os testes que quantifiquem os níveis de IgE sejam indicados para o diagnóstico de APLV, alguns autores acreditam que a resposta de IgE alérgeno-específico seja controversa (40). Em um estudo, foi proposta a dessensibilização oral por introdução progressiva de leite em crianças com APLV mediada por IgE, e o protocolo apresentou-se seguro e eficiente. Os autores relataram alteração imunológica caracterizada por um aumento dos níveis de IgG4 específico do antígeno, redução de IgE e IL-5, e diminuição da produção de IL-13 (20).

Existem relatos de que o leite hidrolisado em suas diferentes apresentações não causa reações alérgicas em torno de 90% das crianças que fazem seu uso. Entretanto, 10% das crianças são intolerantes a estes produtos mesmo hidrolisados (41). Por mais que o índice de intolerância seja menor, ressalta-se a importância do uso de leite com ausência total dos peptídeos α -lactoglobulina, β -lactoglobulina e caseína, no sentido de eliminar absolutamente qualquer alergenicidade (42), pois os peptídeos β -lactoglobulina, caseína e α -lactoglobulina são os principais alergênicos do leite de vaca (17).

Outros estudos discutem que crianças alérgicas ao leite de vaca foram capazes de estimular a produção de IgE a partir de epítopos de proteínas do leite de ovelha, cabra e búfala. Discute-se ainda que o polimorfismo dessas proteínas provoque reação imunogênica e reatividade cruzada (22). Há concordância de que a alergia as proteínas do leite estejam limitadas a suspensão da ingestão de leite (43).

Foi revelado que o aquecimento do leite em altas temperaturas sob longa duração resulta em baixa alergenicidade, uma vez que a temperatura causa destruição dos epítopos conformacionais das proteínas do leite, levando à desestruturação tridimensional desses alérgenos, e como consequência, baixa capacidade de ligação da IgE (44). Os autores reportaram em seu estudo que o leite aquecido acima de 95 °C durante o tempo mínimo de 30 minutos não provocou ligação detectável de IgE em paciente após sua ingestão. Sendo assim, a ingestão do leite nessas condições seria uma das alternativas a ser considerada para os portadores de APLV.

Aplicações biotecnológicas nas alergias às proteínas do leite. A técnica de transferência de genes está entre os recursos mais promissores da biotecnologia. E a partir desse advento, pode-se esperar no futuro a modificação do genoma do gado doméstico, visando eliminar os alérgenos do leite. A transferência e incorporação de novos genes aos cromossomos de animais, faz deles transgênicos (45).

O método mais utilizado para o desenvolvimento de animais transgênicos é a microinjeção de sequências de DNA no pronúcleo do zigoto recentemente fertilizado. Nessa técnica, o DNA se integra aleatoriamente a um cromossoma, e em seguida, é expresso nos tecidos somáticos e germinativo. Além disso, a transferência de genes mediada por esperma tornou-se alvo de estudo para alterar os embriões de gado, assim como transferência nuclear, que produz animais geneticamente idênticos mediados por células embrionárias e somáticas (46).

Outras estratégias corretivas exploradas para regular a alergia alimentar refere-se à proteína recombinante de *Brucella abortus* (U-Omp16), que mostrou, durante a sensibilização por exposição oral de leite de vaca, ser capaz de melhorar a resposta imunológica reduzindo os sinais clínicos, os anticorpos IgE do soro, e modular a resposta Th2 em favor da imunidade Th1 (47). Esses efeitos sugerem que a sensibilização alérgica mediada por IgE pode ser melhorada. Sendo assim, U-Omp16 revelou-se um adjuvante promissor para administração oral de forma segura para o tratamento da alergia as proteínas do leite.

Diante da necessidade de eliminar a alergenicidade da β -globulina, novas abordagens estão tornando-se prosperas, como é o caso da segmentação de genes e RNA de interferência, capazes de eliminar a alergenicidade do leite de ruminantes sem que comprometa os demais componentes nutricionais (48). O desenvolvimento de nucleases quiméricas, nucleases ativadoras de transcrição, CRISPR/Cas9, mostraram-se promissoras e eficientes na segmentação de genes (45). As nucleases dedo de zinco são ferramentas eficientes para modificação de genes específicos (49), atuando de forma sinérgica para induzir ruptu-

ras na cadeia dupla de DNA, bem como mecanismo de reparo (50, 51).

Em um estudo utilizando nucleases dedo de zinco para nocaute do gene de β -lactoglobulina, foi reportado que essas proteínas poderiam ser utilizadas como ferramentas de modificação genética para eliminar o gene BLG em fibroblastos de cabra, haja vista que este sistema tem um grande potencial para produção de cabras livre de BLG (48).

Também é possível observar que a tecnologia transgênica foi o ponto de partida para o desenvolvimento de uma gama de animais clonados, assim, como, tornou realidade a expressão de proteínas recombinantes com extensos benefícios a saúde humana (52).

CONCLUSÃO

Portando, reforça-se a importância do diagnóstico da APLV frente ao tratamento e à prevenção dos agravos relacionados a essa enfermidade. Nesse contexto, tornou-se claro o impacto clínico ocasionado, e que os testes com maior grau de segurança para diagnosticar os casos de APLV são os protocolos que utilizam a provocação dos sintomas. O estudo mostrou que apesar da alergia alimentar ser potencialmente grave, a terapia empregada no controle é basicamente relacionada à restrição do alimento. Finalmente, existem várias técnicas promissoras que podem ser empregadas para erradicar ou minimizar a alergia ao leite, tais como proteína recombinante U-Omp16, nucleases quiméricas como as dedos de zinco e CRISPR/Cas9, RNA de interferência, clonagem e microinjeção de DNA.

REFERÊNCIAS

1. Errázuriz G, Lucero Y, Ceresa, S, Gonzalez M, Rossel M, Vives A. Características clínicas y manejo de lactantes menores de 1 año con sospecha de alergia a proteína de leche de vaca. *Rev Chil Pediatr*. 2016;87(6): 449-454. DOI: 10.1016/j.rchipe.2016.06.007.
2. Luyt D, Ball H, Makwana N, Green MR, Bravin K, Nasser SM, Clark AT. Standards of Care Committee (SOCC) of the British Society for Allergy and Clinical Immunology (BSACI). BSACI guideline for the diagnosis and management of cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(5): 642-672. DOI: 10.1111/cea.12302.
3. Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Roberts G, Muro A, Sheikh A, Eaaci H. Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2014;69(8): 992-1007. DOI: 10.1111/all.12423. Epub 2014 May 10.
4. Sommanus S, Kerddonfak S, Kamchaisatian W, Vilaiyuk S, Sasisakulporn C, Teawsomboonkit W, Benjaponpitak S. Cow's milk protein allergy: immunological response in children with cow's milk protein tolerance. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2013;32(2):171-177. DOI: 10.12932/AP0319.32.2.2013.

5. Feliu MNI. Abordage de la alergia alimentaria em atención primaria. *FMC*. 2016;23(6): 328-334. Vol.23 Núm.6. DOI: 10.1016/j.fmc.2015.10.008.
6. Stefani GP. Perfil **clínico-epidemiológico** de pacientes encaminhadados com diagnóstico de alergia a **proteína do leite de vaca ao ambulatório** de referência de **goiânia entre 2011 e 2012**. [Tese]. Goiânia: Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, 2015.
7. Prescott SL, Pawankar R, Allen KJ, Cambell DE, Sinn JKH, Fiocchi A, Ebisawa M, Sampson HA, Beyer K, Lee BW. A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy J*. 2013;6(1): 21. DOI: 10.1186/1939-6-21.
8. Ring J, Akdis C, Behrendt H, Lauener RP, Schappi G, Akdis M, et al. Davos declaration: allergy as a global problem. *Allergy*. 2012;67(2): 141-143. DOI: 10.1111/1398-9995.2011.02770.
9. Solé D, Silva LR, Filho NAR, Sarni ROS, Pastorino AC, Jacob CMA, et al. Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar : documento conjunto elaborado pela Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia. *Rev Bras Alerg Imunopatol*. 2008;31(2): 26.
10. Perry TT, Pesek RD. Clinical manifestations of food allergy. *Pediatr Ann*. 2013;42(6):96-101. DOI: 10.3928/00904481-20130522-09.
11. Pereira ACS, Moura SM, Constant PBL. Alergia alimentar: Sistema imunológico e principais alimentos envolvidos. *Ciências Biológicas e da Saúde*. 2008;29(2): 189-200.
12. Vandenplas Y, Abuabat A, Al-Hammadi S, Aly GS, Miqday MS, Shaaban SY, Torbey PH . Middle east consensus statement on the prevention, diagnosis, and management of cow's milk protein allergy. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2014;17(2): 61-73. DOI: 10.5223/pghn.2014.17.2.61.
13. Chan KA, Pereira FP, Junior JC. Food allergy in childhood: analysis of geographic distribution. *Pediatr Moder*.2013;13(9): 369.
14. Teixeira ARN. Alergias Alimentares na infância. Universidade do Porto. [Monografia]. Porto: Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, 2010.
15. Neves FVO, Beck CML, Gushken, AKF, Yonamine GH, Castro APBM, Dorna MB, Santos CJN, Pastorino AC. Cow's milk allergy: Evaluating tolerance through skin-prick test. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2016;62(6):537-546. DOI: 10.1590/1806-9282.62.06.537.
16. Skripak JM, Matsui EC, Mudd K, Wood RA. The natural history of IgE- mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;105(20): 1172-1177. DOI: 10.1016/j.jaci.2007.08.023.
17. Rouelle C, Arion A, Prevost V. Management and prevention of cow's milk protein allergy: Contribution of community pharmacists. In: *Ann Pharm Fr*. 2017;75(3):236-244 DOI: 10.1016/j.pharma.2017.01.001.
18. Rancé F. Allergie aux protéines du lait de vache (APLV), exploration et prise em charge. 2013. Disponível <http://www.allergienet.com/allergie-proteines-du-laite-vache/>. Acesso em 15/02/2017.
19. Patel, BY, Volcheck GW. Food Allergy: Common Causes, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2015;90(10): 1411-1419.
20. Perezábad L, Reche M, Valbuena T, López-Fandiño R, Molina E, López-Expósito I. Oral Food Desensitization in Children With IgE-Mediated Cow's Milk Allergy: Immunological Changes Underlying Desensitization. *Allerg and Clin Immunol*. 2017;9(1): 35-42. DOI: 10.4168/aaair.2017.9.1.35.
21. Hobbs CB, Skinner AC, Burks AW, Vikery BP. Food allergies affect growth in children. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2015;3(1): 133-134. DOI: 10.1016/j.jaip.2014.11.004.
22. Fotschki J, Szyk AM, Laparra JM, Markiewicz LH, Wróblewska B. Immune-modulating properties of horse milk administered to mice sensitized to cow milk. *J Dairy Sci*. 2016;99(12): 9395-9404.
23. Kazem-Farzandi N, Taheri-Kafrani A, Haertlé T. β -lactoglobulin mutation Ala86Gln improves its ligand binding and reduces its immunoreactivity. *Int J Bioll Macromol*. 2015;81: 340-348. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.08.013.
24. Stipp AT, Bignardi, PR, Poli-Frederico RC, Sivieri K, Costa MR. Polimorfismos genéticos da kappa-caseína e da beta-lactoglobulina e produção de leite em bovinos. *Arq Bras MedVet. Zootec*. 2013;65(1): 275-280.
25. Pescuma M, Hébert EM; Haertlé T, Chobert, JM, Mozzi F, Font de Valdez G. Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus CRL 454 cleaves allergenic peptides of β -lactoglobulin. *Food Chem*. 2015; 170: 407-414. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.08.086.
26. El Mecherfi, KE, Rouaud O, Curet S, Negaoui H, Chobert JM, Kheroua O, Saidi D, Haertlé T. Peptic hydrolysis of bovine beta-lactoglobulin under microwave treatment reduces its allergenicity in an ex vivo murine allergy model. *Int. J. Food Sci. Technol*. 2015;50:356-364. DOI: 10.1111/ijfs.12653.
27. Valenta R, Ferreira F, Focke-Tejkl M, Linhart B, Niederberger V, Swoboda I, Vrtala S. From allergen genes to allergy vaccines. *Annu Rev Immunol*. 2009;28: 211-241. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101218.
28. Martorell A, de la Hoz B, Ibáñez MD, Bone J, Terrados MS, Michavilla A. Oral desensitization as a useful treatment in 2-year-old children with cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(9): 1297-1304. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2011.03749.xEpubApr11.

29. Sánchez-García S, Cipriani F, Ricci G. Food Allergy in childhood: phenotypes, prevention and treatment. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2015;26: 711-720. DOI: 10.4168/aa.2017.9.5.423.
30. Kaya A, Erkoçoğlu M, Civelek E, Çakir B, Kocabaş CN. Prevalence of confirmed ige-mediated food allergy among adolescents in turkey. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013;24(5):456–462. DOI: 10.1111/pai.1209.
31. Marrs T, Lack G. Why do few food-allergic adolescents treat anaphylaxis with adrenaline? – Reviewing a pressing issue. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013;24(6):222–229. DOI: 10.1186/s13223-015-0094-9.
32. Goossens NJ. Food allergy knowledge of parents – is ignorance bliss? *Pediatr Allergy Immunol*. 2013;24(6):567–573. DOI: 10.1111/pai.12099.
33. Burbank AJ, Sood P, Vickery BP, Wood RA. Oral Immunotherapy for food allergy. *Immunol Allergy Clin*. 2016;36(1): 55-69. DOI: 10.18176/jiaci.0177.
34. Gorelik M, Narisety SD, Guerrero AL, Keet CA, Bieneman HP, Hamilton RG, Wood RA, Schroeder JT, Frischmeyer-Guerreiro PA. Suppression of the immunologic response to peanut during immunotherapy is often transient. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(5): 1283–1292. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.11.010.
35. Vickery BP, et al. Sustained unresponsiveness to peanut in subjects who have completed peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2): 468–475. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.11.007.
36. Burks AW, Wood RA, Jones SM, Sicherer SH, Fleischer DM, Scurlock AM, et al. Sublingual immunotherapy for peanut allergy: long-term follow-up of a randomized multicenter trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(5): 1240-1248. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.12.1917.
37. Narisety SD, Frischmeyer-Guerrero PA, Keet CA, Gorelik M. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of sublingual versus oral immunotherapy for the treatment of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(5): 1275-1282. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.11.005.
38. Bellini F, Ricci G, Remondini D, Pession A. Cow's milk allergy (CMA) in children: identification of allergologic tests predictive of food allergy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2014;46(3):100–105. PMID: 24853567.
39. Dupont C. How to reintroduce cow's milk? *Pediatr Allergy Immunol*. 2013;24(7): 627–632. DOI: 10.1111/pai.12131.
40. García-Ara C, Pedrosa M, Belver MT, Martín-Muñoz MF, Quirce S, Boyano-Martínez T. Efficacy and safety of oral desensitization in children with cow's milk allergy according to their serum specific IgE level. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013;110(2): 290-294. DOI: 10.1016/j.anai.2013.01.013.
41. Ammar F, Boissieu D, Dupont C. Allergie aux hydrolysats de protéines. À propos de 30 cas. *Arch Pediatr*. 1999;6(8): 837-843. DOI: 10.1016/j.aller.2009.05.003.
42. Tounian P, Sarrío F. Alimentation de l'enfant de 0 à 3 ans. Elsevier Masson, Issy-les-Moulineaux, France, 2011, p. 89.
43. Koletzko S, Niggemann B, Arato A, Dias JA, Heuschkel R, husby S, et al. Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: espghan gi committee practical guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;55(2): 221-229.
44. Sopo SM, Greco M, Monaco S, Bianchi A, Cuomo B, Liotti L, Iacono ID. Matrix effect on baked milk tolerance in children with IgE cow milk allergy. *Allergol Immunopathol*. 2016;44(6): 517-523. DOI: 10.1016/j.aller.2016.03.005.
45. Gaj, T, Gersbach, CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Tren in Biotech*. 2013;31(7): 397-405. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
46. Lotti SM, Polkoff KM, Rubessa M, Wheeler MB. Modification of the Genome of Domestic Animals. *Journal of the American Chemical Society. Anim Biotech*. 2017;139(11): 3920-3929. DOI: 10.1080/10495398.2016.1261874.
47. Smaldini PL, Ibañez AE, Fossati CA, Cassataro J, Doceña GH. Oral delivery of *Brucella* spp. recombinant protein U-Omp16 abrogates the IgE-mediated milk allergy. *Hum Vacc & Immunoth*. 2014;10(7): 2015-2023. DOI: 10.416/hv.28845.
48. Song Y, Cui C, Zhu H, Li Q, Zhao F, Jin Y. Expression, purification and characterization of zinc-finger nuclease to knockout the goat beta-lactoglobulin gene. *Prot Express and Purif*. 2015;112: 1-7. DOI: 10.1016/j.pep.2015.04.004.
49. Wang J, Friedman G, Doyon Y, Wang NS, Li CJ, Miller JC, Hua KL, Yan JJ, Babiarz JE, Gregory PD. Targeted gene addition to a predetermined site in the human genome using a ZFN-based nicking enzyme. *Genome Res*. 2012;22(7):316–1326. DOI: 10.1101/gr.122879.111. Epub 2012 Mar 20.
50. Li P, Estrada JL, Burlak C, Tector AJ. Biallelic knockout of the alpha-1,3 galactosyltransferase gene in porcine liver-derived cells using zinc finger nucleases. *J. Surg. Res*. 2013;181(1): 39-45. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.01.018.
51. Klymiuk N, Fezert P, Wunsch A, Kurome M, Kessler B, Wolf E. Homologous recombination contributes to the repair of zinc-finger-nuclease induced double strand breaks in pig primary cells and facilitates recombination with exogenous DNA. *J. Biotechnol*. 2014;177(1): 74–81. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.01.018.
52. Zhang R, Guo C, Sui S, Yu T, Wang J, Li N. Comprehensive Assessment of Milk Composition in Transgenic Cloned Cattle. *Plos One*. 2012;7(11): 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049697>.