

## **Alergia alimentar a rosáceas e frutos secos. A propósito de um caso clínico**

Isabel Carrapatoso<sup>1</sup>, Beatriz Tavares<sup>1</sup>, Celso Pereira<sup>1</sup>, Fernando Rodrigues<sup>2</sup>, Ana Barbosa<sup>3</sup>, Celso Chieira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Serviço de Imunoalergologia. Hospitais Universidade de Coimbra.

<sup>2</sup> Serviço de Patologia Clínica. Hospitais Universidade de Coimbra.

<sup>3</sup> DPC Amerlab

### **Resumo**

Os autores descrevem o caso de uma doente com 30 anos de idade, sem antecedentes pessoais prévios de atopia e que aos 14 anos inicia episódios de urticária e angioedema generalizados após ingestão de frutos da família das rosáceas. As crises de angioedema com envolvimento das vias aéreas superiores motivam recurso a serviço de urgência hospitalar. A partir dos 27 anos inicia queixas com carácter semelhante após ingestão de frutos secos. O estudo imunoalergológico demonstrou sensibilização a frutos da subfamília *Prunoideae*, frutos secos e outros alimentos de origem vegetal botanicamente não relacionados. Estudos de SDS-PAGE/Immunoblotting permitiram identificar reactividade a alergénios de baixo peso molecular. Ensaios de inibição de Immunoblotting demonstraram a existência de reactividade cruzada entre proteínas alimentares identificadas.

**Palavras-chave:** Alergia alimentar, rosáceas, frutos secos, SDS-PAGE/Immunoblotting; ensaios de inibição de Immunoblotting

### **Abstract**

The authors report the case of a 30 years old female, without respiratory allergy, who complained of generalised urticaria and angioedema, at the age of 14, after the ingestion of the Rosaceae fruits. All the episodes of angioedema were severe, with superior airways involvement, and were treated in the Emergency Room. At the age of 27 she began to have the same com-

*Continua na página seguinte*

*plaints when eating nuts. Sensitisation to the Prunoidea subfamily, nuts and other unrelated plant-derived foods were demonstrated by skin prick tests and serum specific IgE determination.*

*SDS-PAGE and Immunoblotting analysis revealed reactivity to low molecular weight allergens. Immunoblotting inhibition assays showed the presence of cross-reactivity between some of the identified food proteins.*

**Key Words: Food allergy, rosaceae, nuts, SDS-PAGE/Immunoblotting; Immunoblotting inhibition.**

## INTRODUÇÃO

A alergia alimentar à maçã, ao pêssigo e a outros frutos da família das rosáceas é relativamente frequente nos países da Europa do Norte, particularmente em indivíduos atópicos, sensibilizados a pólenes de bétula. A base imunológica para este fenómeno é a existência de reactividade cruzada mediada pela IgE entre pólenes e alergénios alimentares de origem vegetal (<sup>1,2</sup>). Os principais alergénios, actualmente identificados, implicados na alergia às rosáceas são as proteínas homólogas da Bet v 1, as profilinas (Bet v 2) e as proteínas de transferência de lipídeos (LTPs). Proteínas pertencentes a estes grupos foram identificadas em diversos frutos e pólenes (<sup>3-9</sup>). Está demonstrado que dentro de cada grupo existe uma importante homologia na sequência de aminoácidos o que explica a reactividade cruzada a nível de epítomos IgE. Os alergénios homólogos da Bet v 1 estão envolvidos em mais de 90% das alergias a rosáceas em países da Europa Central e do Norte. Nestas zonas, em que a bétula é uma espécie autóctone, o fruto da família das rosáceas responsável por um maior número de reacções alérgicas é a maçã. Este facto é explicado por uma homologia significativa

entre Bet v 1 e Mal d 1, o alergénio major da maçã. (<sup>1</sup>). As manifestações clínicas mais características enquadram-se num síndrome de alergia oral (SAO) que surge frequentemente associado a polinose. Contrariamente, nos países mediterrânicos, a sensibilização a Bet v 1 é detectada em menos de 10% dos alérgicos a rosáceas (<sup>3,4</sup>). Nestes países, particularmente no centro de Espanha, observa-se com relativa frequência alergia a rosáceas associada a polinose a gramíneas, sendo a sensibilização a profilinas relevante. Nos últimos anos demonstrou-se que os alergénios mais importantes envolvidos na alergia a rosáceas em países mediterrânicos, nomeadamente em Espanha e Itália, são as LTPs – *Lipid transfer proteins* -(<sup>5,6</sup>). Estes alergénios não apresentam reactividade cruzada com pólenes de bétula ou gramíneas mas, exibem reactividade cruzada com pólenes de artemisia. Nos indivíduos alérgicos a rosáceas e sem polinose associada, as LTPs são os únicos alergénios até agora identificados (<sup>7</sup>). As manifestações clínicas na sensibilização a LTPs são habitualmente sistémicas e graves. (<sup>2,8</sup>). Estes alergénios de baixo peso molecular (9-11 KDa) isolados em diversos frutos da subfamília *Prunoideae* (pêssigo, alperce, ameixa, cereja) exibem uma grande homologia, sendo frequente-

mente responsáveis pela extensa reactividade cruzada entre estes frutos (6,9).

Estudos recentes de diversos autores têm demonstrado reactividade cruzada entre LTPs de frutos e vegetais pertencentes a diferentes famílias taxonómicas, sendo actualmente considerados como alergénios com extensa distribuição no reino vegetal (10,11).

### CASO CLÍNICO

Doente do sexo feminino, com 30 anos de idade, enviada à consulta de Imunoalergologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC) para investigação de episódios de urticária e angioedema generalizados desencadeados após a ingestão de frutos. Descreve o início da sintomatologia aos 14 anos após a ingestão de maçã. A partir dos 15 anos refere queixas semelhantes com a ingestão de pêsego, referindo sintomas mais graves com envolvimento das vias aéreas superiores. A partir dos 27 anos inicia sintomatologia com a ingestão de amendoim. A doente abandonou o consumo destes frutos. Todos os episódios motivaram recurso a serviço de urgência hospitalar com administração de terapêutica parentérica, pelo que a doente foi encaminhada para estudo diferenciado em consulta de especialidade. Nos antecedentes pessoais destaca-se a ausência de sintomatologia respiratória sugestiva de patologia alérgica.

### METODOLOGIA DIAGNÓSTICA E RESULTADOS

Em concordância com o protocolo seguido no nosso Serviço para estudo das urticárias e angioedemas recorrentes realizou-se um estudo analítico sumário que incluía entre outros a análise da bioquímica sanguínea, hemograma, doseamento de imunoglobulinas séricas, estudo do complemento

(C3, C4, C1q e inibidor da esterase de C1), pesquisa da presença de anticorpos anti-nucleares e anti-tiroideus, determinação da função tiroideia. Foram efectuados testes cutâneos de alergia por picada (*prick*) a extractos comerciais de aeroalergénios comuns e alergénios alimentares de origem vegetal (Leti®). Como controlo positivo foi utilizado cloridrato de histamina (10 mg/ml) e como controlo negativo uma solução glicerosalina. A bateria de aeroalergénios incluía extractos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *farinae* e *microceras*; *Acarus siro*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, Gato, Cão, *Blatella germanica*, *Dactylis glomerata*, *Festuca pratensis*, *Lolium perene*, *Phleum pratensis*, *Secale cereale*, *Triticum sativum*, *Poa pratensis*, *Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris*, *Plantago lanceolata*, *Chaenopodium album*, *Olea europea*, *Corylus avelana*, *Robinia pseudoacacia*, *Tilia cordata*, *Betula pubescens*, *Quercus robur*, *Pinus radiata*. Os alergénios alimentares de origem vegetal testados foram verduras diversas e leguminosas (alface, couve, alho, cebola, pimento, tomate, feijão verde, nabo, grão, soja, ervilha, louro, pimenta), frutos (laranja, limão, ananás, kiwi, pêra, morango, pêsego, maçã, ameixa, cereja, melão, melancia, manga, banana) e sementes/frutos secos (avelã, pinhão, amendoim, amêndoa, semente de girassol, castanha, noz, pistachio). As picadas foram realizadas utilizando lancetas metálicas tipo Morrow-Brown (Prick Lancetter-Dome Holister Stier). Após 20 minutos foram determinados os diâmetros médios das pápulas. Consideraram-se positivos os testes correspondentes às pápulas com diâmetro médio igual ou superior em 3 mm ao controlo negativo. Procedeu-se ao doseamento de IgE específica para os alergénios alimentares suspeitos (Unicap Pharmacia) e em função dos resultados dos testes cutâneos.

Uma biópsia cutânea de pele sã, em período intercrítico, foi também efectuada.

Os testes cutâneos de alergia revelaram reactivi-

dade a diversos alimentos de origem vegetal (Quadro I). O doseamento sérico de imunoglobulinas encontrava-se dentro dos parâmetros de referência (IgE total - 45 KU/L), enquanto que se observou aumento de IgE específica para pêsego e maçã – classes 2 (Quadro I). O estudo do complemento (C3, C4, C1q e inibidor da esterase de C1) e da função tiroideia (T3, T4 e TSH) revelou-se normal. Os anticorpos anti-nucleares e anti-tiroideus foram negativos e a biópsia cutânea não demonstrou alterações.

Em função dos resultados obtidos neste estudo, foi aconselhada a evicção de frutos da família das rosáceas e ainda de sementes e frutos secos, não se registando novos episódios de urticária ou angioedema.

Com o objectivo de identificar as proteínas envolvidas nas reacções alimentares alérgicas nesta doente, prosseguiu-se a investigação laboratorial através da determinação de IgE específica por estudos de *Immunoblotting* (DPC Amerlab ®)

Estudos de *SDS-PAGE/immunoblotting* permitiram identificar uma única banda no *Immunoblotting* do pêsego com peso molecular aproximado de 11,3 KDa (fig. 1). Para a maçã foi detectada uma banda com peso molecular aproximado de 15,4 KDa (fig. 2). Não se identificaram bandas nos *immunoblotings* de amendoim, castanha, avelã ou noz. Estes resultados são concordantes com os da determinação de IgE específica por Unicap (Pharmacia®).

Realizaram-se estudos de inibição de *immunoblotting* com o intuito de investigar a existência de reactividade cruzada entre as proteínas alimentares identificadas. Para o pêsego e maçã foram efectuados estudos de inibição utilizando extracto total do fruto. Para a maçã realizou-se ainda inibição com extracto de pólen de bétula. Nos estudos de inibição utilizaram-se extractos comercializados para prick-teste (Leti ® - concentração proteica 10 mg/ml). Os ensaios de inibição foram efectuados de acordo com o procedimento preconizado pelos

Quadro I - Resultados dos testes cutâneos e determinações de IgE específica		
Testes cutâneos (pápula em mm - Leti®)	IgE sérica específica – KU/L( Unicap Pharmacia®)	
<b>Histamina</b>	6 mm	
<b>Aeroalergénios:</b> (Ácaros, baratas, fungos, cão, gato, gramíneas, ervas, árvores)	Negativos	
<b>Alergénios alimentares de origem vegetal:</b>		
• Pêsego	14 mm	1,76 KU/L (classe 2)
• Noz	12 mm	< 0,35 KU/L (classe 0)
• Amendoim	9 mm	< 0,35 KU/L (classe 0)
• Maçã	8 mm	1,45 KU/L (classe 2)
• Avelã	8 mm	< 0,35 KU/L (classe 0)
• Castanha	7 mm	< 0,35 KU/L (classe 0)
• Feijão verde	7 mm	< 0,35 KU/L (classe 0)
• Pinhão	6 mm	< 0,35 KU/L (classe 0)
• Semente girassol	6 mm	< 0,35 KU/L (classe 0)
• Amêndoa	6 mm	< 0,35 KU/L (classe 0)



**Figura 1** - Immunoblotting de pêsego e inibição com os diferentes extractos.



**Figura 2** - Immunoblotting de maçã e inibição com os diferentes extractos.

Laboratórios DPC-Amerlab. A identificação dos pesos moleculares e as respectivas intensidades foram analisadas com o auxílio do software Quantiscan (Biosoft, Cambridge, UK). Para cada um dos extractos comerciais utilizados foi determinada a percentagem de inibição com base no valor da intensidade da banda obtida com o soro inteiro da doente de forma a valorizar a possível reactividade cruzada entre os diferentes alergénios.

Como se pode observar na fig. 1 para o *Immunoblotting* de pêsego conseguiu-se uma inibição total com extracto de amendoim (ausência da banda de ligação da IgE- 100% inibição), e quase total com extracto total de pêsego (85% de inibição). Verifica-se ausência de inibição com extractos de noz, semente de girassol e maçã (0% de inibição). Estes resultados permitem inferir que a proteína de 11,3 KDa identificada na alergia alimentar ao pêsego não apresenta reactividade cruzada com alergénios da noz, semente de girassol ou maçã. No entanto existe reactividade cruzada com extracto de amendoim.

Nos ensaios de *Immunoblotting* da maçã identificou-se uma banda de peso molecular aproxi-

mado de 15,4 KDa. De acordo com a figura 2, verifica-se, para o *Immunoblotting* da maçã, inibição total para o extracto da maçã e ausência de inibição para o extracto de pêsego total e pólen de bétula, não se verificando por isso reactividade cruzada.

## DISCUSSÃO

Estudos efectuados pelo grupo de Pastorello <sup>(6)</sup> demonstraram que as LTPs são importantes alergénios na família *Rosaceae*. Os doentes com alergia alimentar a frutos desta família, sem clínica de polinose, reagem habitualmente apenas a estas proteínas de baixo peso molecular. Este facto sugere a possibilidade de sensibilização por outra via para além da inalatória ao contrário do que sucede com a sensibilização a Bet v 1 <sup>(7)</sup>.

As LTPs das plantas parecem representar uma nova classe de alergénios ubiqüitários específicos para alimentos como frutos frescos, secos e outros vegetais. A sensibilização às LTPs assume uma importante relevância clínica já que estas proteínas são termoestáveis exibindo sequências amino-

cídicas bem conservadas que podem condicionar um alto grau de reactividade cruzada entre alimentos de origem vegetal botanicamente não relacionados (<sup>12,16</sup>).

No caso clínico descrito a ausência de polinose e a ocorrência de reacções sistémicas graves após ingestão de frutos da família das rosáceas levantou a suspeita de estarmos perante um caso de sensibilização a LTPs. Confirmada a sensibilização mediada pela IgE a pêsego e maçã através de realização de testes cutâneos e determinação de IgE específica (Unicap Pharmacia) prosseguiu-se o estudo laboratorial com o objectivo de caracterizar as proteínas envolvidas nas reacções alimentares alérgicas desta doente. A realização de estudos de *Immunoblotting* (DPC Amerlab) permitiu identificar reactividade imunológica a uma proteína de peso molecular aproximado de 11,3 KDa para o pêsego e de uma proteína de 15,4 KDa para a maçã. As manifestações de alergia alimentar, com carácter sistémico e elevada gravidade clínica, limitaram a realização de prova de provocação oral específica por razões éticas. Em diversos estudos publicados as reacções alimentares induzidas por LTPs são descritas habitualmente como reacções graves (<sup>9,11,12</sup>). Num estudo recente de Pastorello é preconizado o diagnóstico laboratorial de alergia a LTPs tendente a evitar a confirmação diagnóstica por prova de provocação oral (<sup>6</sup>).

As LTPs são uma família de polipeptídeos altamente conservados com um peso molecular compreendido entre 9 e os 11 KDa e que se encontram amplamente distribuídos no reino vegetal. Estão implicados na formação da cutícula dos vegetais e participam na defesa frente a patogénios sendo classificadas como proteínas de defesa do grupo PR14 (<sup>12,13</sup>). São termoestáveis e resistentes à digestão com pepsina o que os converte em potentes alergénios alimentares e explica a ocorrência de manifestações sistémicas (<sup>11, 12</sup>). São os únicos alergénios até agora identificados nos doentes alérgicos a rosáceas sem polinose associada, comportando-se

como verdadeiros alergénios alimentares e originando sensibilização por via oral (<sup>17,18</sup>).

Asero e col. demonstraram que um grande número de doentes com hipersensibilidade às LTPs e alergia a rosáceas podem manifestar sintomatologia após ingestão de uma grande variedade de alimentos vegetais contendo LTPs. Num estudo recente este autor descreve uma alta prevalência de reactividade cruzada com significado clínico entre LTPs de rosáceas e frutos secos (<sup>12</sup>). Curiosamente nesta doente observou-se inibição total da ligação da IgE ao extracto de pêsego quando se adicionou extracto comercial de amendoim, o que sugere a existência de elevada homologia na sequência aminoacídica das proteínas implicadas na alergia alimentar a estes dois frutos. A sensibilização ao amendoim foi demonstrada através da reacção positiva ao teste por picada. As determinações de IgE específica pelos métodos Unicap (Pharmacia) e *Immunoblotting* (DPC Amerlab) não permitiram identificar ligação de IgE específica do soro da doente a qualquer proteína do amendoim. Quando se utilizou o extracto de amendoim comercializado para *prick teste* no estudo de inibição de *Immunoblotting* observou-se inibição total da ligação da IgE do soro da doente ao extracto de pêsego sugerindo extensa reactividade cruzada. Estes resultados permitem-nos reflectir sobre o valor informativo e limitações dos diferentes testes de diagnóstico disponíveis e estão de acordo com uma maior sensibilidade descrita para os testes cutâneos. O facto de não se ter encontrado ligação da IgE específica do soro da doente a proteínas alérgicas quando se utilizaram os métodos Unicap e *Immunoblotting* poderá dever-se à presença de níveis infraliminares de IgE específica ou à ausência da proteína alérgica nos extractos utilizados para diagnóstico. O diagnóstico definitivo de alergia alimentar ao amendoim seria estabelecido, neste caso, através da realização de prova de provocação oral que por razões óbvias não foi efectuada. No entanto a relação da ocorrência de sintomatologia

poucos minutos após a ingestão de amendoim descrita pela doente em diversas ocasiões e a sensibilização demonstrada nos testes cutâneos levam-nos a considerar com grande probabilidade este diagnóstico, reforçado pela melhoria clínica com a dieta restritiva em amendoim e frutos secos.

A proximidade do peso molecular da proteína identificada no *Immunoblotting* do pêssigo (11,3 KDa) com os pesos moleculares descritos na literatura para as LTPs leva-nos a admitir com grande probabilidade de estarmos perante uma alergia a LTPs, reforçada pelo carácter sistémico e gravidade das manifestações clínicas aliada à ausência de polinose. Para a maçã a inexistência de reactividade cruzada com pólen de bétula é concordante com a ausência de polinose nesta doente. Curiosamente o peso molecular encontrado (15,4 KDa) é distante do descrito para LTPs, não apoiando a suspeita inicial de alergia a LTPs na maçã.

A evolução relevante nos métodos laboratoriais de investigação observada nos últimos anos tem permitido um isolamento e caracterização de alergénios cada vez mais acurado. Assim, têm-se conseguido identificar diversos grupos de proteínas com estrutura semelhante apresentando grande homologia nas sequências aminoacídicas e com funções bioquímicas similares<sup>(13)</sup>. É provável que num futuro próximo, o diagnóstico de alergia alimentar, particularmente a alimentos de origem vegetal, se baseie na identificação de sensibilização a grupos de alergénios com funções bioquímicas idênticas e/ou com grande homologia molecular. Nas reacções graves, a utilização de alergénios recombinantes permitirá a identificação *in vitro* das proteínas implicadas, evitando o recurso a métodos de diagnóstico com maior risco como a prova de provocação oral. O conhecimento dos diversos alimentos que poderão conter as proteínas responsáveis pelas manifestações de alergia alimentar conduzirá a um aconselhamento dietético mais orientado, tendente a prevenir a ocorrência de

reacções sistémicas graves como as provocadas pelas LTPs.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, Breiteneder H, Valenta R, Ebner H. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 962-9.
2. Fernández Rivas M, van Ree R, Cuevas M. Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 728-733.
3. van Ree R, Fernández Rivas M, Cuevas M, van Wijngaarden M, Aalberse RC. Pollen related allergy to peach and apple: an important role for profilin. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 726-734.
4. Dashner A, Fernández Crespo J, Pascual CY. Specific IgE to recombinant vegetal panallergen (rBet v 2) and fruit allergy in pollinic patients. *Allergy* 1998; 53: 614-618.
5. Leonart R, Cistero A, Carreira J, Batista A, Moscosos J. Food allergy. Identification of the major IgE-binding component of peach (*Prunus persica*) *Ann Allergy* 1992; 69:128-130.
6. Pastorello EA, Ortolani C, Farioli L. Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum and cherry in patients with oral allergy syndrome: an in vivo and in vitro study. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 699-707.
7. Pastorello EA, Pravettoni V, Farioli L et al. Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1099-1106.
8. Asero R Detection and clinical characterization of patients with oral allergy syndrome caused by stable allergens in Rosaceae and nuts. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;83:377-383.
9. Sánchez-Monge R, Lombardero M, Garcia Selles FJ, Barber D, Salcedo G. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 514-519.
10. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D et al. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122: 20-32.
11. Pastorello E, Pompei C, Pravettoni V et al. Lipid transfer proteins and 2s albumins as allergens. *Allergy* 2001. 56: Suppl. 67: 45-47.
12. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D et al. Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy* 2002; 57:900-906.
13. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:27-36.
14. Pastorello E, Farioli L, Pravettoni V et al. The major allergen from peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:520-6.
15. Díaz-Perales A, Lombardero M, Sánchez-Monge R, et al. Lipid-transfer protein as potential plant-panallergens cross-reactivity among proteins of Artemisia pollen, Castanea, nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1403-1410.
16. Ballmer-Weber B. Lipid transfer protein as a potential panallergen? *Allergy* 2002; 57: 873-875.
17. Rivas F. Reactividad cruzada en frutas y vegetales. Proteínas transportadoras de lípidos. *Allergol et Immunopathol* 2003; 31 (3):141-146.
18. Rivas F., Cuevas M. Peels of *Rosaceae* fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clin Exp Allergy* 1999, 29: 1239-47.