

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Nutrición y Bromatología I



**CARACTERÍSTICAS DE LA FUNCIÓN INMUNE  
CELULAR EN PACIENTES CON ALERGIA O  
INTOLOERANICA A LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE  
DE VACA: ESTUDIO COMPARATIVO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Sonia Samartín Sáenz

Bajo la dirección de la Doctora:

Ascensión Marcos Sánchez

**Madrid, 2003**

**ISBN: 84-669-2043-9**

**TESIS DOCTORAL  
SONIA SAMARTÍN SÁENZ**

**"CARACTERÍSTICAS DE LA FUNCIÓN INMUNE CELULAR  
EN PACIENTES CON ALERGIA O INTOLERANCIA  
A LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE DE VACA:  
ESTUDIO COMPARATIVO"**

**DIRECTOR:  
ASCENSIÓN MARCOS SÁNCHEZ**

**INSTITUTO DEL FRIO. DEPARTAMENTO DE  
METABOLISMO Y NUTRICIÓN**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS**

**2003**

**Tesis Doctoral presentada por**

**Sonia Samartín Sáenz**  
**Aspirante al Grado de Doctora en Farmacia**

**Director de la Tesis Doctoral,**

**Dra. Ascensión Marcos Sánchez**  
**Departamento de Nutrición y Metabolismo**  
**Instituto del Frío (CSIC)**

**VºBº Tutor de la Tesis,**

**Prof. Titular Francisco Sánchez Muniz**  
**Departamento de Nutrición y Bromatología I**  
**Facultad de Farmacia (UCM)**

INSTITUTO DEL FRÍO (CSIC)  
CIUDAD UNIVERSITARIA  
28040 MADRID  
ESPAÑA  
Fax: 34-91-5493627  
Teléfono:34-91-5490038

ASCENSIÓN MARCOS SÁNCHEZ, Investigador científico del Instituto de Frío (CSIC)

**CERTIFICA:**

Que el estudio objeto de la presente Memoria titulada "Características de la función inmune celular en pacientes con alergia o intolerancia a las proteínas de la leche de vaca: estudio comparativo", presentada por Sonia Samartín Sáenz para optar al Grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Instituto de Frío (CSIC).

Que dicho estudio, realizado de forma íntegra en el Instituto de Nutrición, ha sido concluido de forma satisfactoria, por lo que autorizamos a su presentación a fin de que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que conste donde proceda se firma el presente documento en Madrid a 22 de abril de dos mil tres.

Dra. Ascensión Marcos Sánchez  
Directora de la Tesis Doctoral

*Me gustaría agradecer a las muchas personas que han contribuido con su apoyo, compañía y cariño en los años dedicados a la realización de esta tesis.*

*A mi directora de tesis Ascensión Marcos por su confianza, inestimable ayuda e iniciarme con su entusiasmo en la metodología de la investigación.*

*A mi tutor, Francisco Sánchez Muniz del Departamento de Nutrición, por su apoyo en la realización de este estudio.*

*A Ranjit Chandra, por su confianza, su generosa dedicación y su inestimable apoyo durante todo el tiempo de elaboración de esta tesis.*

*A la directora del Departamento de Nutrición y Bromatología I, Ana M<sup>a</sup> Requejo por su atención y por haberme permitido la presentación de este trabajo.*

*A todos los profesores y ayudantes de dicho Departamento y del Instituto que cuando lo he necesitado han estado dispuestos a ayudarme.*

*A Angel Nogales por haber dado la oportunidad de llevar a cabo este estudio en el servicio de Neumología y Alergias del Hospital 12 de Octubre, así como a todo el servicio y en especial, a los doctores Gloria García Hernández y Antonio Martínez Gimeno, por su colaboración y apoyo en el presente estudio.*

*A la empresa DANONE, por la financiación aportada para la realización de este trabajo.*

*A Alberto Alvarez y Amalia por su ayuda en el Citómetro de Flujo.*

*A mis compañeros y amigos: Ana, Bea, Olga, Sonia, Esther, Javi, Marcela, Ligia Esperanza, Rocío, Sole, Julia, Anabel, Ligia, por prestarme su apoyo y comprensión y por todos los momentos de alegría compartidos que han hecho más agradables especialmente, los momentos de dificultad.*

*A Ana Pérez, Stefani, Bea Sarria, Pilar, Metodío, Andrés, Luis, compañeros del Departamento y con los que he compartido distintos momentos durante estos años. A Isabel Orvay por su gran afecto y disponibilidad.*

*A Laura Barrios por su ayuda inestimable en el tratamiento estadístico de los datos.*

*A mis padres, por su esfuerzo, ánimo y apoyo incondicional, y por deberles todo lo que soy. A Marga, mi hermana, a Jaime, Jorge y Santiago, y al resto de mi familia por todo el interés y cariño que me han demostrado durante todo este tiempo.*

*A todos mis amigos, que se han interesado por la tesis durante estos años.*

*A mis padres*

## LISTA DE BREVIATURAS EMPLEADAS

<b>AGB</b>	Area grasa del brazo
<b>AGM</b>	Acido graso monoinsaturado
<b>AGP</b>	Acido graso poliinsaturado
<b>AGS</b>	Acido graso saturado
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>AMB</b>	Area muscular del brazo
<b>AMBc</b>	Area muscular del brazo corregida
<b>AN</b>	Anorexia nerviosa
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>BN</b>	Bulimia nerviosa
<b>CHCM</b>	Concentración de hemoglobina corpuscular media
<b>CMB</b>	Circunferencia muscular del brazo
<b>CRH</b>	Factor de estimulación de corticosterona
<b>FA</b>	Fosfatasa alcalina
<b>FAD</b>	Dinucleotido flavina
<b>fMLP</b>	N-formil-MetLeuPhe.
<b>FMN</b>	Nucleotido flavina
<b>GGT</b>	Gamma glutamil transferasa
<b>GH</b>	Hormona de crecimiento
<b>GOT</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>GPT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>HCM</b>	Hemoglobina corpuscular media
<b>IL</b>	Citoquinas
<b>IMC</b>	Indice de masa corporal
<b>IR</b>	Ingestas recomendadas españolas
<b>MG</b>	Masa grasa
<b>MLG</b>	Masa libre de grasa
<b>MMT</b>	Masa muscular total
<b>PB</b>	Perímetro del brazo
<b>PBi</b>	Pliegue bicipital
<b>PC</b>	Peso correcto
<b>PI</b>	Pliegue suprailiaco
<b>PSb</b>	Pliegue subescapular
<b>PT</b>	Pliegue tricipital
<b>RBP</b>	Retinol binding protein
<b>REE</b>	Gasto energético en reposo
<b>T3</b>	Triyodotironina
<b>T4</b>	Tiroxina
<b>TBK/TBW</b>	Potasio corporal total/ agua corporal total
<b>TCA</b>	Trastornos del comportamiento alimentaria
<b>THCR</b>	Test de hipersensibilidad retardada cutánea
<b>TIBC</b>	Capacidad total de fijación de hierro
<b>TMB</b>	Tasa metabólica basal
<b>TMR</b>	Tasa metabólica en reposo
<b>TPP</b>	Tiamina pirofosfato
<b>VCM</b>	Volumen corpuscular medio

<b>1.- OBJETIVO</b> .....	2
<b>2.- SITUACIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
<b>2.1.- ALERGIA E INTOLERANCIA ALIMENTARIAS</b> .....	5
2.1.1.- Aspectos generales .....	5
2.1.2.- Criterios diferenciales .....	6
2.1.3.- Epidemiología .....	10
2.1.3.1. Prevalencia – Incidencia .....	10
2.1.3.2. Mortalidad .....	12
2.1.4.- Sistema inmunitario gastrointestinal: tolerancia inmunológica .....	13
2.1.4.1. Población inmunitaria .....	13
2.1.4.2. Tipos de respuesta inmunológica a antígenos alimentarios .....	15
2.1.4.3. Captación de antígenos y macromoléculas .....	16
2.1.4.4. Tolerancia inmunológica .....	17
2.1.5.- Alergenos .....	19
2.1.5.1. Características generales .....	19
2.1.5.2. Reacciones cruzadas .....	20
2.1.5.3. Proteínas de la leche de vaca .....	20
2.1.6.- Patogénesis .....	23
2.1.6.1. Factores genéticos .....	23
2.1.6.1.1. Equilibrio entre linfocitos T helper 1- T helper 2 .....	24
2.1.6.1.2. Sistema inmunitario del neonato .....	26
2.1.6.2. Factores ambientales .....	27
2.1.6.2.1. Exposición al antígeno .....	29
2.1.6.2.2. Infecciones .....	29
2.1.7.- Mecanismos de la alergia alimentaria .....	32
2.1.8.- Manifestaciones de la alergia alimentaria .....	37
2.1.8.1. Cutáneas .....	38
2.1.8.2. Gastrointestinales .....	39
2.1.8.3. Respiratorias .....	41
2.1.8.4. Sistémicas .....	41
2.1.9.- Historia Natural .....	43
2.1.10.- Diagnóstico .....	45
2.1.10.1. Historia clínica .....	46
2.1.10.2. Pruebas de provocación oral .....	46
2.1.10.3. Pruebas inmunológicas .....	48
2.1.10.3.1. Determinación de inmunoglobulina E .....	49
2.1.10.3.1.1. <i>In vivo</i> : Pruebas cutáneas .....	49
2.1.10.3.1.2. <i>In vitro</i> .....	51
2.1.10.3.2. Otras pruebas diagnósticas .....	53
2.1.10.3.2.1. Proliferación de linfocitos .....	53
2.1.10.3.2.2. Determinación de inmunoglobulina G .....	55
2.1.10.3.2.3. Supoblaciones linfocitarias .....	57
2.1.10.3.2.4. Determinación de la producción de citoquinas .....	61



2.1.11.- Tratamiento -----	69
2.1.11.1. Dietas de exclusión -----	69
2.1.11.2. Fórmulas infantiles -----	70
2.1.11.2.1. Hidrolizados proteicos -----	71
2.1.11.2.2. Fórmulas a base de soja -----	72
2.1.11.2.3. Dietas elementales -----	72
2.1.11.3. Desensibilización -----	73
2.1.11.4. Nuevos avances -----	74
2.1.11.5. Farmacológico -----	75
2.1.12. Prevención -----	76
2.1.12.1. Identificación de niños de alto riesgo -----	76
2.1.12.2. Medidas preventivas -----	79
2.1.12.2.1. Exposición a alérgenos vía oral -----	80
2.1.12.2.2. Exposición ambiental -----	83
<b>3.- SUJETOS Y MÉTODOS -----</b>	<b>85</b>
3.1.- POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO -----	86
3.2.- DISEÑO EXPERIMENTAL -----	87
3.2.1. Criterios de inclusión -----	87
3.3.- PARÁMETROS ESTUDIADOS -----	87
3.3.1. Parámetros Antropométricos -----	88
3.3.2. Pruebas de Alergia -----	88
3.3.3. Parámetros Hematológicos -----	88
3.3.4. Parámetros Inmunológicos -----	89
3.4.- DESARROLLO DE LOS ESTUDIOS -----	90
3.4.1. Obtención de muestra -----	90
3.5.- TÉCNICAS ANALÍTICAS -----	91
3.5.1. Parámetros Antropométricos -----	91
3.5.2. Pruebas de Alergia -----	91
3.5.3. Parámetros Hematológicos -----	97
3.5.4. Parámetros Inmunológicos -----	98
3.6.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO -----	104
<b>4.- RESULTADOS -----</b>	<b>107</b>
<b>5.- DISCUSIÓN -----</b>	<b>141</b>
5.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES -----	142
5.2.- PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS -----	143
5.3.- PRUEBAS DE ALERGIA -----	146
5.3.1. Historia clínica -----	146
5.3.2. Pruebas de provocación oral con el alérgeno sospechoso -----	151

---

5.3.3. Pruebas cutáneas tipo <i>Prick</i> -----	154
5.3.4. Determinación de inmunoglobulina E total en suero -----	156
5.3.5. Determinación de inmunoglobulina E específica en suero -----	158
5.3.6. Determinación de inmunoglobulina G frente a leche de vaca -----	159
<b>5.4.- PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS</b> -----	<b>163</b>
5.4.1. Serie eritrocitaria -----	164
5.4.2. Serie trombocítica -----	165
5.4.3. Serie leucocitaria -----	165
<b>5.5.- PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS</b> -----	<b>166</b>
5.5.1. Recuento y Porcentaje de subpoblaciones linfocitarias -----	167
5.5.2. Secreción de citoquinas -----	171
5.5.2.1. Secreción de citoquinas <i>in vivo</i> -----	171
5.5.2.2. Secreción de citoquinas <i>in vitro</i> -----	175
5.5.3. Proliferación de linfocitos estimulados -----	183
<b>6.- CONCLUSIONES</b> -----	<b>188</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA</b> -----	<b>193</b>

## 1.- OBJETIVO

Las enfermedades atópicas entre las que se incluyen el asma, las rinitis alérgicas, y las alergias alimentarias, afectan a gran grupo de población especialmente en países industrializados. Existe evidencia sobre el aumento notable en la prevalencia general de las enfermedades alérgicas. La alergia alimentaria es de gran importancia dentro de este tipo de enfermedades. Además, al ser los alérgenos de los alimentos los primeros a los que se enfrenta el sistema inmune, la alergia a los alimentos constituye con frecuencia una de las primeras manifestaciones alérgicas del individuo atópico. En concreto, son las proteínas de la leche de vaca las primeras proteínas con las que el sistema inmune se pone en contacto, desarrollando tolerancia inmunológica, o en el menor de los casos, sensibilización. Por ello, es una causa frecuente de consulta pediátrica.

Tan sólo unos pocos alimentos son los responsables de la mayor parte de las reacciones alérgicas: huevo, leche y pescado en el niño; y frutos secos, pescados y mariscos en el adulto.

Por otra parte, hay que considerar a las alergias alimentarias como una de las principales causas de reacciones anafilácticas. Constituyen la forma más severa de presentación de una reacción de tipo alérgico. Estas reacciones se dan en pacientes altamente sensibles a alimentos, afectando múltiples órganos y sistemas y pudiendo incluso ocasionar *shock*, poniéndose en peligro la vida del paciente.

El término alergia alimentaria se ha utilizado de forma indiscriminada, aplicándolo de manera a veces incorrecta al definirlo como cualquier reacción adversa debida a un alimento o aditivo alimentario. Referido a veces como “hipersensibilidad”, la alergia alimentaria se trata de un tipo de reacción adversa a los alimentos que hay que distinguir de las reacciones de intolerancia y de las reacciones tóxicas. En la alergia alimentaria está implicado el sistema inmune mientras que las causas de la intolerancia a los alimentos pueden ser muy diversas: factores enzimáticos, idiosincrasia del individuo, etc, no estando comprobada la intervención del sistema inmunológico. En la

alergia alimentaria las reacciones de tipo I mediadas por inmunoglobulina (Ig) E, son generalmente la base inmunológica. Por ello, este tipo de reacciones han sido las más frecuentemente estudiadas. De hecho, la base de los tests de diagnóstico de la alergia alimentaria se basan en la determinación de IgE. Sin embargo, existe evidencia sobre el hecho de que otros mecanismos inmunológicos juegan un importante papel en la patogénesis. En los últimos años se ha incrementado el interés por los mecanismos celulares en la patogénesis de la hipersensibilidad alimentaria.

Por otra parte, la intolerancia alimentaria, a la que algunos autores refieren como alergia no mediada por IgE por falta de mecanismo mediado por IgE demostrable, no presentan patogenia conocida, sugiriéndose a veces un mecanismo inmunológico. De ahí la necesidad del estudio sobre los mecanismos responsables de estos procesos.

De acuerdo con numerosos estudios, a pesar del alto porcentaje de niños con alergia a las proteínas de la leche de vaca que acaban desarrollando tolerancia entre los 2 y 3 años de edad, muchos de ellos desarrollan alergia a aeroalergenos u otras enfermedades alérgicas. Por ello, la puesta en marcha especialmente en niños de mayor riesgo atópico, de medidas preventivas frente al desarrollo de estas enfermedades alérgicas sería de gran interés económico y de salud pública. Por tanto, la identificación de niños con mayor probabilidad de desarrollar alergia es de gran importancia. Un mayor conocimiento sobre los mecanismos biológicos que tienen lugar en el desarrollo de los distintos tipos de reacciones de alergia/intolerancia alimentarias sería útil para el estudio de posibles marcadores biológicos de estas alteraciones en el sistema inmunitario.

Por este motivo, nos hemos planteado, por un lado evaluar el posible papel de otros mecanismos en el diagnóstico tanto de la alergia como de la intolerancia a las proteínas de la leche de vaca así como, estudiar las posibles diferencias entre ambos grupos de estudio.

Por otra parte, y en relación a la evolución de los pacientes, se han tratado de analizar posibles biomarcadores del desarrollo de tolerancia en ambos grupos de pacientes.

## **2.- SITUACIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1.- ALERGIA E INTOLERANCIA ALIMENTARIAS**

#### **2.1.1.- ASPECTOS GENERALES**

Las enfermedades alérgicas constituyen una de las patologías más frecuentes, especialmente en la edad infantil. La mayoría de estas enfermedades se presentan en edades tempranas en el niño, siendo más frecuente la aparición de sensibilización a alimentos en los dos primeros años de vida, y en años posteriores la sensibilización a aeroalergenos (Lorente y col., 2001).

Hace casi 4500 años, el emperador chino Shen Nung ya describió una forma de reacción adversa a alimentos. Sin embargo, el término alergia no fue acuñado hasta 1906 por Clements Von Pirquet. La palabra alergia, viene del griego *allos*, que significa "otro" y *ergon*, que significa "fuerza, trabajo". Así, definió como un estado de "reactividad alterada" en el cual la presencia de una sustancia determinada producía una reacción anormal en el sujeto que sufría este tipo de enfermedad. En los primeros años del uso de esta palabra, no se conocía con precisión los mecanismos de esta "reactividad alterada" y en general, tenía una acepción muy amplia. Hubo que esperar hasta principios del siglo XX para que se presentaran las primeras pruebas de laboratorio que pudieran explicar estas reacciones. Praunitz y Kustner (1921) demostraron la existencia de un factor sérico que era capaz de transferir la alergia al pescado que padecía Kustner a su colaborador no alérgico, Prausnitz. Poco después de ingerir pescado, Prausnitz desarrolló una erupción cutánea en el lugar donde le había sido inyectado el suero de su compañero alérgico 24 horas antes. Este factor sérico fue identificado más tarde como Ig E.

Las enfermedades alérgicas se presentan siguiendo una serie de patrones clínicos bien establecidos. En la práctica diaria se da unas veces más importancia al síndrome (conjunto de signos y síntomas que se presentan asociados), por ejemplo en el asma, y otras al alergeno que produce la enfermedad cuyas manifestaciones clínicas son variables; por ejemplo, las alergias alimentarias o a la picadura de insectos.

Alrededor de un 20% de individuos en países occidentales padece algún tipo de enfermedad alérgica entre las que se incluyen asma, rinitis, dermatitis atópica y alergia alimentaria. Esta prevalencia está aumentando de manera considerable y parece ser que se correlaciona con un mejor standard de vida y un mayor control de enfermedades infecciosas durante la infancia (Geha, 2000). Debido al aumento progresivo de las alergias alimentarias, la posible gravedad de las reacciones y su cronicidad, representan un problema de salud pública importante en cuanto a morbilidad y al gasto sanitario que conlleva (Samartín y col., 2001).

Aunque la alergia es una patología conocida desde hace bastante tiempo, debido a la creciente incidencia, es cada vez mayor el interés para conseguir un mejor conocimiento de los factores etiopatogénicos implicados en ella con el fin de mejorar el tratamiento y sobre todo de prevenir su aparición.

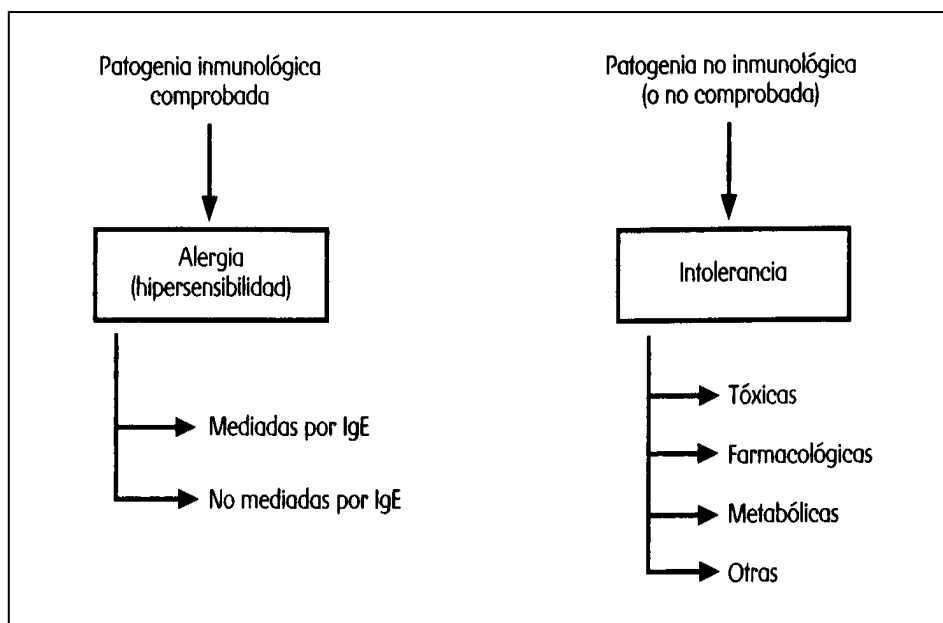
### **2.1.2.- CRITERIOS DIFERENCIALES**

Dentro de las enfermedades alérgicas nos centraremos en las alergias alimentarias, y en concreto en la alergia a las proteínas de la leche de vaca por constituir un tipo de reacción adversa a este alimento.

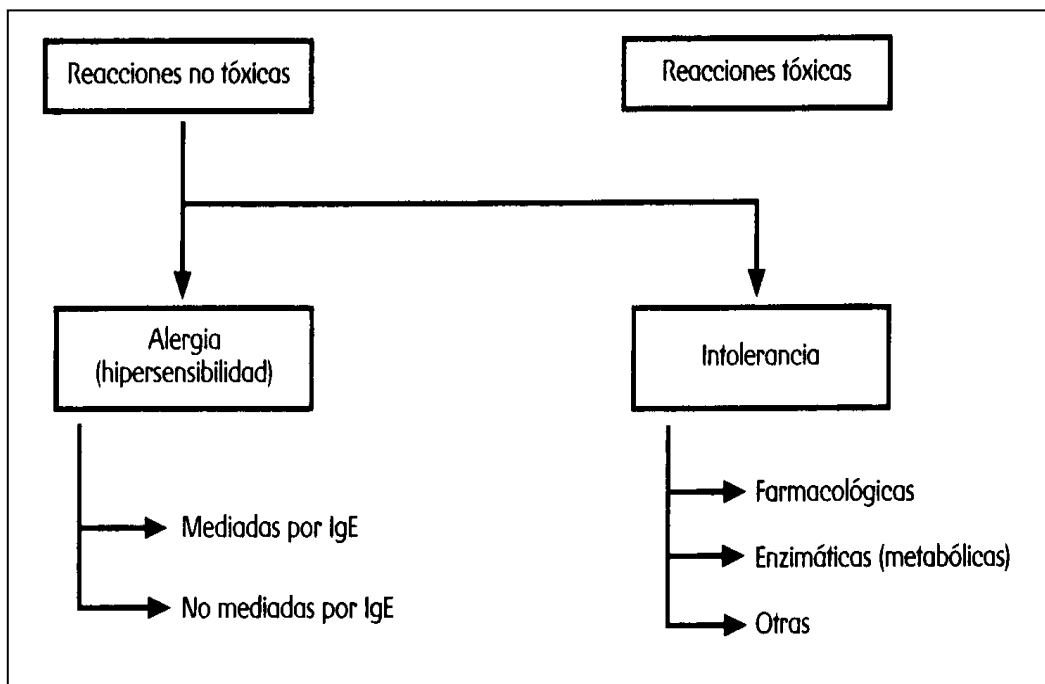
La Academia Europea de Alergia e Intolerancia Clínica ha propuesto definiciones estándar para las reacciones de origen alimentario basadas únicamente en el mecanismo que las produce (Bruijnzeel-Koomen y col., 1995). Se denomina reacción adversa a un alimento a cualquier respuesta clínica anormal secundaria a la ingestión de un alimento (American Academy of Allergy and Immunology/NIAID, 1984).

Las reacciones adversas a los alimentos han sido divididas en reacciones tóxicas y reacciones no tóxicas. Las reacciones tóxicas son debidas a sustancias que pueden contaminar un alimento o que se encuentran de forma natural en el mismo. Las reacciones no tóxicas dependen de la susceptibilidad del individuo a determinados alimentos y pueden ser mediadas (alergia alimentaria) o no (intolerancia alimentaria) por el sistema inmune (Ortolani y Vighi, 1995; Businco y col., 2001). Deben distinguirse las reacciones de

intolerancia propiamente dichas de las reacciones denominadas tóxicas. Ambos tipos se caracterizan por ser dependientes de la dosis, es decir, las manifestaciones clínicas que producen son más intensas cuanto mayor es la cantidad de alimento o aditivo alimentario ingerido. Una característica de las reacciones tóxicas es que ocurren en cualquier individuo que pueda ingerir ese producto en dosis suficientes. En cambio, en las reacciones de intolerancia - al igual que en las alérgicas - la aparición de manifestaciones clínicas ante la ingestión de un producto determinado, a una dosis determinada, está únicamente relacionada con las características del individuo, de manera que esa misma dosis es perfectamente tolerada por cualquier otro individuo sano. Este carácter diferencial ha hecho que la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica modificara ligeramente la clasificación de las reacciones adversas a alimentos (Figuras 1 y 2). Ambos términos, intolerancia alimentaria y alergia alimentaria, se han utilizado y, a veces, se siguen utilizando con un significado similar, lo que ha favorecido la confusión a la hora de analizar los aspectos patogénicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos de estos procesos (Martín y Pascual, 2001).



**FIGURA 1.** Clasificación de las reacciones adversas a alimentos, según el Comité de Alimentos de la Academia Americana de Alergia e Inmunología (1984).



**FIGURA 2.** Modificación de la clasificación de las reacciones adversas a alimentos, efectuada por la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (1995).

De igual forma, las reacciones adversas a las proteínas de la leche pueden dividirse en alergia y en intolerancia a las proteínas de la leche de vaca. La definición de intolerancia a las proteínas de la leche puede llevar a confusión ya que el término se utiliza en los casos en los que no se puede confirmar un mecanismo inmunológico, por la ausencia de estudio inmunológico o por resultados negativos. Alergia e intolerancia a las proteínas de la leche no pueden ser diferenciadas en base a los síntomas, y no existe además, ningún test de laboratorio para el diagnóstico diferencial de alergia y de intolerancia (Bruijnzeel-Koomen y col., 1995).

Las reacciones de intolerancias alimentarias son debidas principalmente a:

- Aminas vasoactivas presentes en algunos alimentos (p.ej., la teobromina en el chocolate, o la tiramina en los quesos curados). Estas aminas presentan propiedades farmacológicas causando los síntomas.



- Trastornos metabólicos como la deficiencia en lactasa: la lactosa no digerida es responsable de los síntomas gastrointestinales.
- Toxinas presentes de forma natural en los alimentos o como contaminantes añadidos durante la preparación o procesamiento.
- Respuestas idiosincrásicas del individuo.

(Cuadro 1) (Kitts y col., 1997; Chandra, 1997; Hosking y col., 2000).

Con objeto de evitar confusiones se definen los siguientes términos:

*Alergenicidad* es la capacidad de una determinada molécula de desencadenar una reacción alérgica en individuos sensibles.

*Antigenicidad* es la capacidad que tiene una determinada molécula de promover en el sistema inmune la síntesis de anticuerpos distintos a la IgE, es decir de IgG, IgA e IgM.

*Inmunogenicidad* es la capacidad que tiene una determinada molécula de estimular el sistema IgE.

*Epítopo* es la parte limitada de la molécula del alérgeno a la que se une el anticuerpo (o el receptor del linfocito).

*Determinantes alérgicos* son epítomos del sistema IgE.

*Determinantes antigénicos* son epítomos de los sistemas IgG, IgA e IgM.

Los determinantes antigénicos suelen ser configuracionales y pueden ser destruidos fácilmente, mientras que los determinantes alérgicos son secuenciales y, por tanto, más resistentes.

*Reactividad cruzada* es la que aparece en la posible interacción entre el lugar de unión de un anticuerpo y el mismo determinante alérgico presente en diferentes moléculas. Todas las moléculas desencadenan reacciones alérgicas en pacientes sensibles a una de esas moléculas incluso sin que exista exposición previa alguna (Businco y col., 2001).

**CUADRO 1.** Causas frecuentes de reacciones adversas a los alimentos no mediadas por el sistema inmune (Intolerancias alimentarias). Adaptado de Chandra (1997); Kitts y col. (1997).

Compuesto	Alimento	Síntomas
<i>Lactosa</i> : actividad lactasa reducida	Leche, yogur, helado	Gastrointestinales: diarrea, flatulencia, distensión abdominal
<i>Aminas vasoactivas</i> Histamina Tiramina Feniletilamina	Queso curado, vino, sardinas, espinacas Queso curado, vino, cerveza, sardinas, levadura, aguacate, frambuesas Queso, chocolate, vino	Urticaria, angiodema, migraña, respiración sibilante Asma, urticaria
<i>Aditivos alimentarios</i> Conservantes: <i>benzoatos</i> Saborizantes: <i>salicilatos</i> Antioxidantes: <i>sulfitos</i>		Urticaria Urticaria Urticaria

### 2.1.3.- EPIDEMIOLOGÍA

#### 2.1.3.1.- PREVALENCIA- INCIDENCIA

Las enfermedades alérgicas constituyen una de las patologías más frecuente en la consulta pediátrica. En la actualidad, se estima que entre un 4% a un 6% de los niños son alérgicos a alimentos, entre un 8% y un 10% padecen asma y casi un 25% sufren de rinitis o conjuntivitis (Lasley, 1999).

En concreto, las alergias/intolerancias alimentarias constituyen un problema frecuente; sin embargo, hay escasez de estudios epidemiológicos. Las estimaciones en la

población general basadas en cuestionarios de frecuencia de síntomas oscilan entre un 4,9% (Cohen y col., 1985) y un 33% (Bender y Matthews, 1981), siendo más frecuentes en edades tempranas. De ahí que los niños hayan sido más estudiados que los adultos.

Sin embargo, la prevalencia en la población general, se estima solamente entre un 1,4-2,4% en estudios que han utilizado pruebas de provocación oral a doble ciego controladas por placebo en subgrupos seleccionados de la población de estudio, indicando que en los estudios anteriores basados en cuestionarios se ha hecho una sobre-estimación (Young y col., 1994).

Los alimentos que causan sensibilización son distintos en adultos y en niños (Ring y Vieluf, 1991). Existen pocos estudios en la población adulta en cuanto a la frecuencia y características de alergias/intolerancias, sensibilización, etc. (Sicherer y col., 1999). En un trabajo reciente en adultos y dentro de un estudio epidemiológico de tipo caso-control, se determinó la frecuencia de alergia/intolerancia alimentaria y la prevalencia de sensibilización a 10 alérgenos alimentarios comunes. Para ello, además de cuestionarios sobre síntomas, se llevaron a cabo pruebas de determinación de la IgE específica en suero frente a aeroalérgenos comunes por CAP-RAST (*radioallergosorbent test*), así como pruebas cutáneas tipo *prick* frente a Ags (Ags) alimentarios e inhalados (Schäfer y col., 2001). Se indicó la existencia de alergia/intolerancia alimentaria en un 20,8% de la población, resultado similar al obtenido en otro estudio en grupos grandes de población en UK (19,9-20,4%) (Young y col., 1994) pero más elevados que en Holanda (12,4%) (Jansen y col., 1994). Por tanto, extrapolando los resultados a la población en general, se estima una prevalencia de alergia/intolerancia en la población general de un 15,5%, y que un 16,8% de la población adulta presenta reacción al test *prick* cutáneo positiva por lo menos frente a un alérgeno alimentario.

En otros estudios la prevalencia oscila entre el 4,9% (Cohen y col., 1985) y el 33% (Bender y Matthews, 1981). Estos resultados son contrapuestos a los obtenidos en estudios epidemiológicos en los que se investiga la alergia/intolerancia alimentaria por pruebas de provocación oral a doble ciego, que indican una prevalencia entre un 1,4% y un 2,4% (Young y col., 1994; Jansen y col., 1994). Como posibles causas de estas grandes diferencias los autores proponen las limitaciones de estos últimos estudios debidas al pequeño tamaño de muestra (n=73 y 93, frente a 1537, respectivamente); los criterios de

selección; el tipo de reacciones estudiadas solo relacionadas de forma leve con las alergias/intolerancias alimentarias (Schäfer y col., 2001). Los resultados muestran que en adultos la sensibilización más frecuente es a avellanas y a cacahuets y, por tanto, distinta a la de la infancia donde la leche y el huevo son los responsables de la mayor parte de las reacciones. Se observa también que las mujeres presentan mayor frecuencia de sensibilización que los hombres (Bender y Matthews, 1981; Young y col., 1994; Jansen y col., 1994).

En otro estudio basado en encuestas epidemiológicas, se estima que en Francia la prevalencia de alergia alimentaria es del 3,52%, siendo 4 veces más frecuente en pacientes con alergia al látex (Kanny y col., 2001).

### **Alergia a las proteínas de la leche de vaca**

La alergia a las proteínas de leche de vaca, es un trastorno frecuente (Martínez-Gimeno y col., 2000), y aunque los datos son variables según el método y las poblaciones estudiadas, puede decirse que su incidencia es de aproximadamente de un 2-3% en los lactantes durante el primer o segundo año de vida (Eggesbo y col., 2001). Host y Halcken en Dinamarca sin previa selección de la muestra, reportan unos resultados de un 2,2% en niños, siendo mediada por IgE aproximadamente en la mitad de los casos. En el estudio Melbourne la prevalencia en la infancia de alergia al huevo es de un 3,2%, seguida de la alergia a la leche de vaca, que es de un 2% a los 2 años de edad (Hosking y col., 2000).

### **2.1.3.2.- MORTALIDAD**

Las enfermedades atópicas en los países industrializados son la principal causa de morbilidad y un factor importante en la mortalidad (Chandra, 2002). Existen pocos datos sobre la incidencia, características clínicas y tratamiento en pacientes con anafilaxia en los servicios hospitalarios de urgencias. Brown y col. (2001) describen que la incidencia de anafilaxia de un servicio de urgencias en Brisbane, Australia, durante un año fue de 1/439. Del 73% con causa conocida, las más comunes fueron por medicamentos, veneno por picaduras de insecto o alimento (Brown y col., 2001). En un reciente estudio retrospectivo

en UK consideran que si la alergia a alimentos en la población infantil es de un 5% y el riesgo de que un niño con alergia muera por reacción anafiláctica es de 1 entre 800000 al año. Los niños alérgicos que además presenten asma tienen mayor riesgo (Macdougall y col., 2002).

#### **2.1.4.- SISTEMA INMUNITARIO GASTROINTESTINAL: TOLERANCIA INMUNOLÓGICA**

Se puede considerar el tracto gastrointestinal (GI) como el principal órgano inmunológico del organismo. Está expuesto a una gran variedad de macromoléculas provenientes de diversas fuentes incluyendo bacterias residentes, alimentos de la dieta, virus y bacterias invasores, etc. El tracto GI y el sistema inmune se enfrentan a una enorme cantidad de proteínas extrañas y patógenos. Mientras el tracto GI debe procesar las proteínas extrañas, el sistema inmune del tracto GI deberá diferenciar entre patógenos y nutrientes (Sorensen y Porch, 2001).

La población celular inmunitaria del tracto GI procede de células pluripotenciales: las células T se desarrollan en el timo como órgano linfoide primario, y las células B en el hígado fetal, y en la médula ósea en los adultos,. El tejido linfoide del GI es el medio ambiente en el que los linfocitos interactúan entre sí y con los Ags, diseminando la respuesta inmune una vez generada, a otros órganos de la economía (Abbas, 2001).

##### **2.1.4.1.- POBLACIÓN INMUNITARIA**

Las células linfoides están organizadas en tres compartimentos: folículos linfoides que forman las placas de Peyer; linfocitos intraepiteliales y linfocitos de la lámina propia.

###### 1) Tejido linfoide organizado formado por las placas de Peyer.

Constituye la parte más importante del tejido linfoide organizado del sistema inmune del tracto GI. Es además, el sitio inductor de inmunidad de las mucosas. Son permeables a la entrada de Ags y responsables de la regulación de la respuesta inmune frente a Ags alimentarios y bacterianos. El epitelio especializado que cubre las placas Peyer contiene

células M. La célula M presenta gran número de vesículas endocíticas para incorporar y transportar el contenido del lumen a través del epitelio. Tiene además un “bolsillo intraepitelial” donde llegan las partículas endocitadas. Dicho “bolsillo” contiene linfocitos y macrófagos que interactúan con las partículas o Ags transportados. Por tanto, las células M transportan los Ags particulados y solubles por fagocitosis. Estos Ag llegan así a las placas de Peyer, y se ponen en contacto con las células inmunocompetentes. Las placas de Peyer contienen todas las células necesarias para inducir y regular una respuesta inmune y en ellas hay áreas de células B, rodeadas de células T.

2) Tejido linfoide difuso micronodular de la lámina propia.

Está infiltrado por linfocitos T y B y células plasmáticas que segregan inmunoglobulinas: 90% del total en forma de IgA, y el 10% por el resto de las inmunoglobulinas.

Los linfocitos T presentes en la lámina propia juegan un importante papel inmunoregulator, y son, en su mayoría linfocitos T *helper* (Th). El marcador definitivo de los linfocitos T es su receptor antigénico, TCR (*T cell receptor*). Según esto se distinguen linfocitos T, con distintos receptores:

- $\alpha\beta$ -: que constituyen el 95% de los linfocitos T.
- $\gamma\delta$ -: que constituyen el 5% de los linfocitos T.

La existencia de las células T con receptor  $\gamma\delta$  fue demostrada a mitad de los años 80 tras clonación de los genes que codifican para los receptores TCR. Su descubrimiento se basó en la semejanza estructural de sus receptores de células T con los de las células T  $\alpha\beta$  (Toyonaga, 1987).

A pesar del porcentaje tan pequeño que las células  $\gamma\delta$  representan comparando con las células  $\alpha\beta$ , sus características funcionales hacen que sean de gran importancia (Liberio, 2000). El principal interrogante es el hecho de que tan sólo alrededor de un 10% de los linfocitos T periféricos llevan el receptor  $\gamma\delta$ . Las células T  $\gamma\delta$  son principalmente  $CD4^-$  y  $CD8^-$ , ocasionalmente  $CD8^+$  y, rara vez  $CD4^+$ . Estas células suprimen la expansión de las

células Th2 CD4<sup>+</sup> que estimulan la formación de IgE. Por ello, unos niveles disminuidos de células  $\gamma\delta$  TCR pudiera estimular la síntesis de IgE (Chen y col., 1996).

Macrófagos, mastocitos, eosinófilos y basófilos forman también parte de la población celular de la lámina propia. La función de estas células es la de amplificar y modular la respuesta inmunológica.

3) Los linfocitos intraepiteliales son células T CD8<sup>+</sup>, linfocitos citotóxicos/supresores.

#### **2.1.4.2.- TIPOS DE RESPUESTA INMUNOLÓGICA A ANTÍGENOS ALIMENTARIOS**

En una respuesta normal, el sistema inmune intestinal defiende los órganos internos de las agresiones del medio ambiente, actuando frente a agentes infecciosos y es capaz de diferenciar entre agentes peligrosos e inocuos. En condiciones patológicas, dicho sistema inmune intestinal reacciona frente a estructuras propias dando lugar a enfermedades autoinmunes o, frente a agentes externos alimentarios inocuos, originando respuestas de hipersensibilidad alimentaria (Simecka, 1998).

Los tipos de respuesta que se producen frente a Ags alimentarios son:

- **Exclusión** inmune: Proceso no inflamatorio mediado por factores inespecíficos (moco, peristaltismo) y específicos (IgAs, IgM). Estos factores impiden el paso de macromoléculas a través del epitelio intestinal.
- **Eliminación** inmune: Si las sustancias extrañas han atravesado la barrera, muchas pueden ser eliminadas de la circulación por anticuerpos específicos, formando complejos antígeno-anticuerpo, así como por mecanismos de defensa innata, tales como complemento, neutrófilos, macrófagos, etc.
- **Regulación** inmune o **tolerancia oral**: Es el proceso central por el cual el tracto intestinal mantiene una homeostasis entre proceso peligroso y no peligroso a nivel

local y sistémico. Es pues, un estado de hiporrespuesta específica inmunológica inducida.

### **2.1.4.3.- CAPTACIÓN DE ANTÍGENOS Y MACROMOLÉCULAS**

La mayoría de las proteínas alcanzan la circulación ya degradadas, pero una pequeña parte lo alcanzan sin degradar. Esto es de gran importancia desde el punto de vista no solamente nutricional sino también por su capacidad sensibilizante o de inducir tolerancia.

Para que tenga lugar la respuesta inmune frente a un antígeno, éste debe ser transportado de la luz intestinal a las placas de Peyer. Como se ha indicado anteriormente, las células M son capaces de llevar a cabo este transporte, constituyendo un paso importante para el inicio de la respuesta inmune. Tras el paso a través de la mucosa y procesamiento por el GALT (*gut associated lymphoid tissue*, tejido linfoide asociado al intestino), el Ag es presentado a través de las moléculas de clase I y II. La presentación preferente es a través de las moléculas de clase I, lo que da lugar a una activación de linfocitos T supresores CD8<sup>+</sup> e inducción de tolerancia. La presentación a través de moléculas clase II activa los linfocitos T CD4<sup>+</sup> con la consiguiente inducción de memoria inmunológica. Existen interacciones reguladoras entre linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. La activación CD8<sup>+</sup> da lugar a una señal negativa a células autorreactivas. La producción de TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*) por los CD8<sup>+</sup> es una señal negativa para las células CD4<sup>+</sup>. Además, en ausencia de señal coestimuladora (CD28-CD80) se induce tolerancia o anergia de las células T (Strobel, 1995).

Las células epiteliales intestinales (CEI) pueden también actuar como células presentadoras del antígeno. Se sabe que las CEI son capaces de procesar y presentar el Ag vía HLA II (Hershberg y Mayer, 2000). El mecanismo no es bien conocido pero parece ser que esta interacción CEI-célula T es de gran importancia en la inducción de respuesta inmune/tolerancia frente a Ags administrados oralmente.



#### **2.1.4.4.- TOLERANCIA INMUNOLÓGICA**

El sistema inmune se encuentra expuesto a múltiples Ags tales como bacterias, virus y parásitos. Además, es a nivel GI donde se encuentra gran parte del sistema inmune (hasta un 70%), estando en contacto con Ags alimentarios frente a los que debe de desarrollar “tolerancia” y evitar una respuesta frente a los mismos que daría lugar a la consecuente reacción alérgica (Lorente y col., 2001).

La tolerancia inmunológica se define como la falta de respuesta a un antígeno que se induce por la exposición previa a dicho antígeno. Un mismo antígeno en sus diferentes formas puede inducir una respuesta inmunitaria o tolerancia. La tolerancia frente a los Ags propios, denominada autotolerancia, es una propiedad fundamental del sistema inmunitario. Se define como la capacidad del sistema inmunitario normal de reconocer y responder a los Ags extraños pero no a los propios. El fracaso de la autotolerancia origina reacciones inmunitarias contra los Ags propios. Estas reacciones se denominan autoinmunidad y los trastornos que provocan son las conocidas como enfermedades autoinmunitarias (Abbas, 2000).

Múltiples factores pueden influir en la respuesta inmune tras el primer contacto con el antígeno (Brandtzaeg, 1997). Los factores genéticos influyen de manera importante, sobre todo por lo que respecta a los niveles de interleuquina (IL) 4 y síntesis de IgE. Sin embargo, hay otros factores también importantes como la edad a la que tiene lugar la primera exposición al antígeno, naturaleza del mismo, dosis, frecuencia y vía de exposición. La edad a la que el niño entra en contacto con el antígeno es importante para el establecimiento o no de tolerancia.

En principio parece que no se establecerá tolerancia inmunológica frente a un aeroalergeno si previamente se ha establecido una respuesta IgE frente al mismo; por el contrario, este hecho estimulará más tarde la producción de IgE. Así pues, el resultado del primer contacto es importante para la subsiguiente sensibilización o tolerancia. Además, otros factores ambientales como enfermedades concurrentes, pueden también influir en la respuesta inmune final (Lorente y col., 2001). Estos factores se tratarán más adelante en el apartado de Patogénesis de la alergia alimentaria.

Los principales mecanismos de tolerancia linfocítica son:

- la muerte celular, denominada delección clonal,
- la inactivación funcional sin muerte celular denominada anergia clonal, y
- la supresión de la activación de los linfocitos y de las funciones efectoras por los linfocitos reguladores.

El primer mecanismo, de delección clonal, contribuye principalmente a la tolerancia central frente a Ags propios, mientras que los otros dos mecanismos se dan en la tolerancia periférica (Roitt, 2000).

Se han estudiado con frecuencia en animales los mecanismos que regulan el desarrollo de tolerancia, estado de hiporrespuesta inmunológica, pero escasamente se encuentran estudios en humanos (Österlund, 1999). El principal mecanismo de tolerancia que tiene lugar en humanos frente a la exposición continua de Ags alimentarios, es la anergia. Las células T específicas frente a un antígeno concreto, contribuyen al mantenimiento de la homeostasis intestinal (Zivny y col., 2001).

La tolerancia oral se debe al contacto de los Ags alimentarios con la mucosa gastrointestinal. Los mecanismos inmunológicos que determinan el desarrollo de tolerancia no son del todo conocidos; pudieran estar relacionados con las células Th3 que inhiben la producción de citoquinas inflamatorias, al tiempo que promueven la producción de IgA. Un defecto en esta regulación llevaría a la inducción de células Th2 responsables de la alergia a alimentos, mientras que la inducción de Th1 podría inducir un estado de hipersensibilidad, como se da en la enfermedad celíaca. La tolerancia a nivel de mucosa respiratoria parece estar inducida de forma similar. La exposición repetitiva de ovalbúmina por vía inhalatoria en animales de experimentación, induce tolerancia mediada por linfocitos CD8<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$ -TCR. Es posible que estos mecanismos demostrados en animales, tengan lugar también en humanos sobre todo en relación a la tolerancia oral ya que a nivel digestivo hay muchas más células CD8<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -TCR que en la mucosa respiratoria (Lorente y col., 2001).

## 2.1.5.- ALERGENOS

### 2.1.5.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES

La mayor parte de los alergenicos alimentarios son glicoproteínas hidrosolubles con pesos moleculares entre 14-40 Kd, pero también moléculas más pequeñas son capaces de producir sensibilización (Chandra, 1997).

Es de esperar que los hábitos alimentarios de los distintos países, dicten los alimentos que con más frecuencia causan sensibilización en cada uno de ellos. Así por ejemplo en Escandinavia, donde el consumo de pescado es elevado, las alergias a este alimento son frecuentes. En nuestro país los alimentos implicados en las reacciones alérgicas son la leche y el huevo, seguidos del pescado (Crespo y col., 1995). De igual forma, el arroz en Japón, los cacahuets en USA y en UK (Pumphrey y Stanworth, 1996), marisco en Italia, son los principales causantes de alergias (Novembre y col., 1998). Por el contrario, en comunidades donde el cacahuete no es común, como en Escandinavia, la alergia a esta leguminosa es rara, o las alergias al pescado en zonas de interior frente a regiones costeras (Chandra, 1997). De igual forma, en países como Alemania donde el consumo de pescado y la soja es poco frecuente, las reacciones adversas a estos alimentos no son comunes (Schäfer y col., 2001). La alergia a crustáceos es frecuente en niños de Filipinas y Singapur donde forma parte de la dieta desde la temprana infancia. No es del todo claro si esta distinta reactividad frente a los alimentos pudiera ser debida a factores genéticos o culturales pero los resultados sugieren que la susceptibilidad genética a la alergia alimentaria pudiera tener lugar a nivel de las células T, modulada por el complejo mayor de histocompatibilidad (Hosking y col., 2000).

Algunas reacciones mediadas por IgE son causadas por agentes "contaminantes" presentes en el alimento. Este es el caso de los aeroalergenicos presentes en las harinas; parásitos como el *Anisakis spp* en el pescado. La ingestión de pescado contaminado con larva de *Anisakis* puede inducir respuesta de tipo IgE con síntomas clínicos de distinta severidad (Pascual y col., 2000).

### **2.1.5.2.- REACCIONES CRUZADAS**

Como ya se explica anteriormente, la reactividad cruzada es debida a la presencia de un mismo epítipo en proteínas de distintos alimentos. Así, determinadas proteínas presentes en el látex (profilinas y quitinasas) están también presentes en frutas y vegetales, siendo responsables de las reacciones cruzadas que tienen lugar entre ambos. Este hecho es de importancia clínica en la prevención de posibles reacciones alérgicas a alimentos entre individuos sensibilizados al látex o a pólenes y viceversa (Kurup y Fink, 2001).

El término síndrome de alergia oral se ha utilizado para describir reacciones que sufrían algunos pacientes generalmente con fiebre del heno, con síntomas orales tras ingesta de frutas frescas o verduras (Kelso y col., 1995). La reactividad cruzada entre el polen y determinados alérgenos alimentarios podría explicar la base molecular de los síntomas alérgicos en pacientes con síndrome de alergia oral, del inglés, *oral allergic syndrome* (OAS). Los alimentos de origen vegetal que con mayor frecuencia se encuentran involucrados en la reacción cruzada con el látex son: aguacate, plátano, castaña, kiwi, avellana, melocotón, papaya, higo, melón, piña y plátano (Kazemi-Shirazi y col., 2000).

Se ha propuesto un mecanismo por el que el polen podría inducir en el tracto respiratorio la respuesta de IgE de reactividad cruzada, la cual sería responsable también de la alergia alimentaria en el síndrome de alergia oral (Kazemi-Shirazi y col., 2000). Se ha observado también la resolución de síntomas en fiebre del heno y síntomas relacionados con determinados alimentos, tras inmunoterapia en pacientes con rinitis alérgica y síntomas orales graves tras ingerir frutas o verduras (Kelso y col., 1995).

Diez-Gómez y col. (1999) han estudiado la implicación de las profilinas (Bet v1 y v2) en el síndrome de alergia a frutas-pólen-látex. Estos resultados abren nuevas vías de investigación en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento en el OAS y otras alergias alimentarias, basados en alérgenos recombinantes de polen responsables de la reactividad cruzada.

### **2.1.5.3.- PROTEÍNAS DE LA LECHE DE VACA**

La leche de vaca contiene alrededor de un 30 a 35 g de proteína por litro. La acción de la enzima renina o la acidificación del pH a 4,6 permiten la obtención de dos fracciones:

- lactosuero, que contiene un 20% de las proteínas de la leche de vaca y,
- el coágulo, con un 80% de las proteínas.

El **suero** contiene principalmente proteínas globulares. Las principales,  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) y  $\alpha$ -lactalbúmina (ALA), son sintetizadas en la glándula mamaria, mientras que otras como la albúmina sérica bovina (BSA), provienen de la sangre. En el coágulo, la **fracción de caseína** (CAS) está constituida por cuatro proteínas codificadas por diferentes genes de un mismo cromosoma: caseínas  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -, y  $\kappa$ . Parece ser que ninguna proteína por sí sola puede ser la principal responsable de la alergenicidad de las proteínas de la leche de vaca (Wal, 2001).

### 1. Estructura y función de las proteínas de la leche de vaca (Cuadro 2):

#### Proteínas de suero:

La **BLG** se presenta en su estado natural como un dímero de 36 kd. Cada subunidad corresponde a un polipéptido de 162 residuos. La molécula presenta 2 puentes disulfuro y una cisteína libre (Fox, 1982). La resistencia de la BLG a hidrólisis ácida y a proteasas permite que la proteína se mantenga inalterada tras la digestión, sea absorbida a través de la mucosa intestinal y presentada a las células inmunocompetentes (Wal, 2001).

La **ALA** es una proteína globular monomérica de 123 aminoácidos con un PM de 14,4 kd y 4 puentes disulfuro. La secuencia completa de aminoácidos de la ALA bovina muestra una gran homología con la ALA humana con un 74% de residuos idénticos y un 6% de residuos similares. Sin embargo, a pesar de esta gran similitud, ha sido identificada como alérgeno en la leche de vaca (Wal, 1998). La ALA es un componente regulador del sistema enzimático de la galactosil transferasa responsable de la síntesis de lactosa (Fox, 1982).

#### Fracción de caseína:

La fracción de **CAS** está constituida por 4 proteínas fosforiladas ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -) que forman agregados, micelas, en suspensión en el lactosuero (Fox, 1982). Difieren en sus

propiedades funcionales ya que  $\alpha$ - y  $\beta$ - son sensibles al calcio mientras que la  $\kappa$ -caseína no lo es. Dichas proteínas presentan características comunes no presentes en otras proteínas de la leche. Las caseínas no se ven afectadas de manera importante en el tratamiento con calor pero son susceptibles a la acción de todas las endopeptidasas y exopeptidasas (Fox, 1982; Wal, 1998).

**CUADRO 2.**

Fracción Proteica	% del total de proteína	Peso molecular
<i>Caseínas</i>	80%	
$\alpha_1$ -caseína	34	23,612-25,228
$\alpha_2$ -caseína	8	23,612-25,228
$\beta$ -caseína	25	23,980
$\kappa$ -caseína	9	19,005
<i>Suero</i>	20%	
$\alpha$ -Lactalbúmina	4	14,174
$\beta$ -Lactoglobulina	9	36,000 (dímero)
Seroalbúmina	1	69,000

(Bernhisel-Broadbent, 1995)

## 2. La caracterización molecular de las estructuras alergénicas de las proteínas de la leche:

Para una mejor comprensión de la relación entre estructura y reactividad inmunológica y el establecimiento de unos criterios en el desarrollo de fórmulas hipoalergénicas, es necesario la caracterización de “epítomos alergénicos” o por lo menos la identificación en las proteínas de fragmentos con capacidad de unión a IgE. Sin embargo, pocos estudios han utilizado el suero de pacientes alérgicos (Wal, 2001).

Se ha demostrado en estudios realizados en grandes grupos de pacientes alérgicos que la mayoría de los pacientes se sensibilizan a varias proteínas, incluyendo BLG, CAS, ALA, BSA, lactoferrina e inmunoglobulinas. Además de la proteína ALA, la CAS y la BLG constituyen los principales alérgenos (Wal, 1998).

Dentro de las proteínas de la leche de vaca, ninguna en particular, ha sido identificada como su principal alérgeno. Igualmente, ninguna de sus fracciones ha sido considerada con mayor capacidad alérgica (Savilahti y Kuitunen, 1992).

En algunos estudios se ha observado que los niños con alergia a las proteínas de la leche de vaca presentan mayores niveles de IgE específica frente a las proteínas de la fracción del suero (Hoffman, 1975) mientras que en niños mayores y en adultos alérgicos, la IgE específica es mayoritaria frente a la fracción de caseína (Docena y col., 1996; Tabar y col., 1996).

En una reciente revisión llevada a cabo por Wal (2001) se concluye que ninguna característica estructural o funcional presente en todas las proteínas de la leche puede ser asociada a alergenidad, aunque algunas regiones homólogas pueden explicar la reactividad cruzada de tipo IgE. Los epítomos son numerosos y están distribuidos a lo largo de las moléculas de proteínas. Pueden estar localizados en partes hidrofóbicas a las que los anticuerpos IgE son inaccesibles en la estructura nativa de las proteínas, pero están disponibles tras el proceso de digestión. La estructura tridimensional de las proteínas es un factor importante en su alergenidad. Sin embargo, los estudios sobre la unión de IgE de pacientes alérgicos, muestran además de la presencia de epítomos conformacionales, la existencia de epítomos lineales. El hecho también de que los residuos de entre 12 y 14 aminoácidos presenten alergenidad, evidencia la importancia del cuidado en el uso de péptidos para la hiposensibilización, y de hidrolizados a partir de proteínas de suero en la dieta de niños altamente sensibilizados.

## **2.1.6.- PATOGÉNESIS**

### **2.1.6.1.- FACTORES GENÉTICOS**

La alergia a los alimentos, como las demás enfermedades alérgicas, tiene un origen multifactorial que incluye factores genéticos, perinatales, endocrinológicos, inmunológicos y factores ambientales. El factor hereditario constituye el principal factor predisponente para sufrir algún tipo de alergia alimentaria ya que los niños con historial familiar presentan mayor riesgo de padecer algún tipo de manifestación atópica más adelante. En

distintos estudios se ha observado una baja incidencia de enfermedades alérgicas en individuos que no presentan antecedentes familiares, mientras que si uno de los progenitores es alérgico, el riesgo es alrededor de un 20-30% y se duplica cuando ambos progenitores están afectados (Chandra, 1997; Roitt, 2000). Si además, ambos padres están afectados por la misma enfermedad la incidencia puede llegar hasta un 50-80% (Businco y col., 2001).

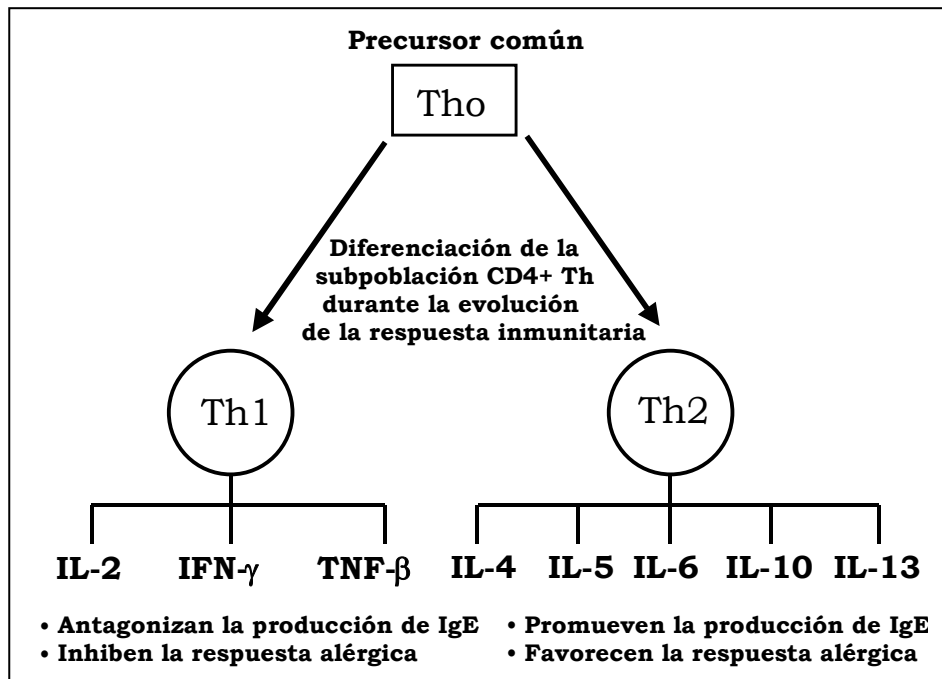
Gracias a la aplicación de técnicas actuales de genética y de biología molecular en el estudio de las enfermedades alérgicas, se ha puesto en evidencia cierta relación entre la atopía y el cromosoma 11q13. De igual forma se han visto implicados genes localizados en los cromosomas 4, 5, 6, 7, 11, 12, 14 y 16 en los mecanismos inmunológicos de la respuesta alérgica, producción de interleuquinas reguladoras y receptores específicos de la respuesta inmune (Lorente y col., 1998).

#### **2.1.6.1.1.- Equilibrio entre linfocitos T *helper* 1-T *helper* 2.**

Las células Th, en función del patrón de citoquinas que producen, pueden representar a uno de los 2 tipos de células Th: células Th1, relacionadas principalmente con la inmunidad celular y que producen IL-2, IFN- $\gamma$  y, células Th2 que están relacionadas con la inmunidad humoral y que producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Figura 3). Las citoquinas tipo Th1 inhiben la producción de citoquinas tipo Th2 y viceversa. La IL-4 desempeña un importante papel en la regulación de la IgE, promoviendo su síntesis a partir de los linfocitos B; mientras que el interferon gamma, IFN- $\gamma$ , al inhibir la proliferación de las células Th2 ejerce efecto inhibitor sobre esta citoquina (Umetsu y DeKruiff, 1997; Geha, 2000). En concreto, el principal efecto de la IL-4 y también de la IL-13 es inducir el cambio de inmunoglobulina hacia la síntesis de IgE. El mecanismo molecular de este cambio, revisado recientemente por Oettgen (2000) se basa en que la unión de IL-4 y también de IL-13 a sus receptores origina una señal de activación que lleva a inducir transcripción del gen correspondiente.

La heterogenicidad entre las células CD4<sup>+</sup> permite explicar la relación inversa entre inmunidad humoral y celular.

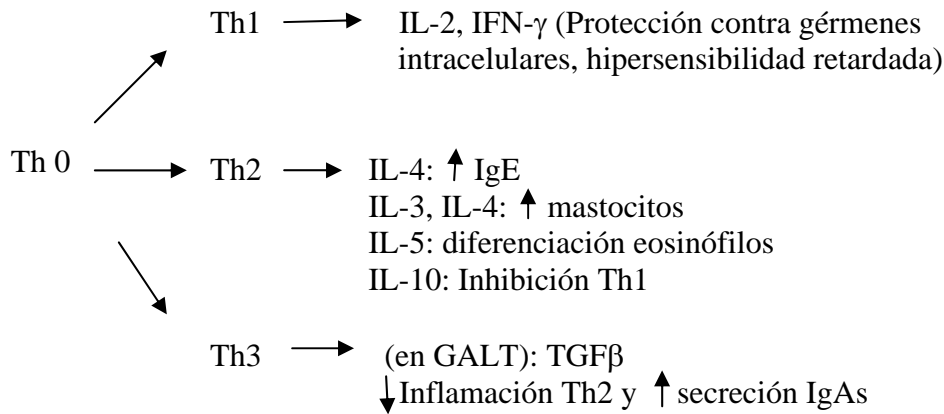




**FIGURA 3.** Subpoblaciones de linfocitos T y su relación con la alergia. Las células *T* helper inician una respuesta inmune con mecanismos efectores diferentes (Buttriss, 2002).

Dentro de las células Th2 la variabilidad en cuanto a la producción de citoquinas pudiera explicar la producción preferente de un isotipo u otro de respuesta inmune humoral: por ejemplo, elevada producción de IgG<sub>4</sub> o de IgE en algunas respuestas y de IgA o de IgG<sub>2</sub>, en otras. Además, existe evidencia de que al menos algunas células Th2 pueden actuar como células reguladoras/inhibidoras suprimiendo la respuesta inmune (p.e. de respuestas inflamatorias autoinmunes como la encefalitis o Diabetes Mellitus). Algunas citoquinas tipo Th2, como el TGF- $\beta$ , tienen propiedades inhibitorias. Por ello, es posible que algunas células Th2 difieran de las células Th2 convencionales ya que estas otras producirían grandes cantidades de TGF- $\beta$ , que inhibe la inmunidad tanto humoral como celular (Umetsu y DeKruiff, 1997). Por ello, otros autores hacen referencia a 3 grupos de subpoblaciones de células Th en función del patrón de citoquinas: Th1 involucradas principalmente en la inflamación y activación de células T citotóxicas, Th2 que producen activación de linfocitos B y las células Th3, que se originan en el GALT que forma parte del MALT (tejido linfoide asociado a mucosas), e inhiben la función de células efectoras mediante la citoquina inhibidora TGF- $\beta$ . Esta citoquina inhibe la inflamación Th2 y

promueve la secreción de IgA secretora a nivel intestinal (Erickson, 2000; Lorente y col., 2001) (Esquema 1).



**ESQUEMA 1.** Subpoblaciones de linfocitos T helper.

#### 2.1.6.1.2.- Sistema inmunitario del neonato.

El desarrollo del feto está determinado, en principio, por factores genéticos, pero puede ser modificado por el estado inmunológico y de nutrición de la madre. Parece ser que durante el embarazo, la supervivencia del feto depende de un cambio en el balance Th1/Th2 hacia un predominio Th2 (Samartín y col., 2002). De acuerdo con esto, el ambiente durante la gestación es altamente inhibidor de las funciones ligadas a los linfocitos Th1 como la presencia de progesterona, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), e interleuquinas 4 y 10 (Blanco-Quirós, 1998). A su vez, la concentración de progesterona presente favorece el desarrollo de células T productoras de IL-4 (Piccini y col., 1995). Así, disminuye la reactividad del sistema inmune de la madre hacia un rechazo del feto (Wegmann y col., 1993; Prescott y col., 1998). En ausencia de este estado y con predominio pues, de células Th1, podría tener lugar un aborto. Además, en abortos espontáneos se ha observado una concentración significativamente menor de IL-4, IL-10, que en abortos voluntarios y, por tanto, tras una gestación normal (Piccini y col., 1998). Los recién nacidos tienen por ello, un patrón de células Th2. La maduración del sistema inmune durante la infancia puede entonces entenderse como un cambio gradual en el feto y

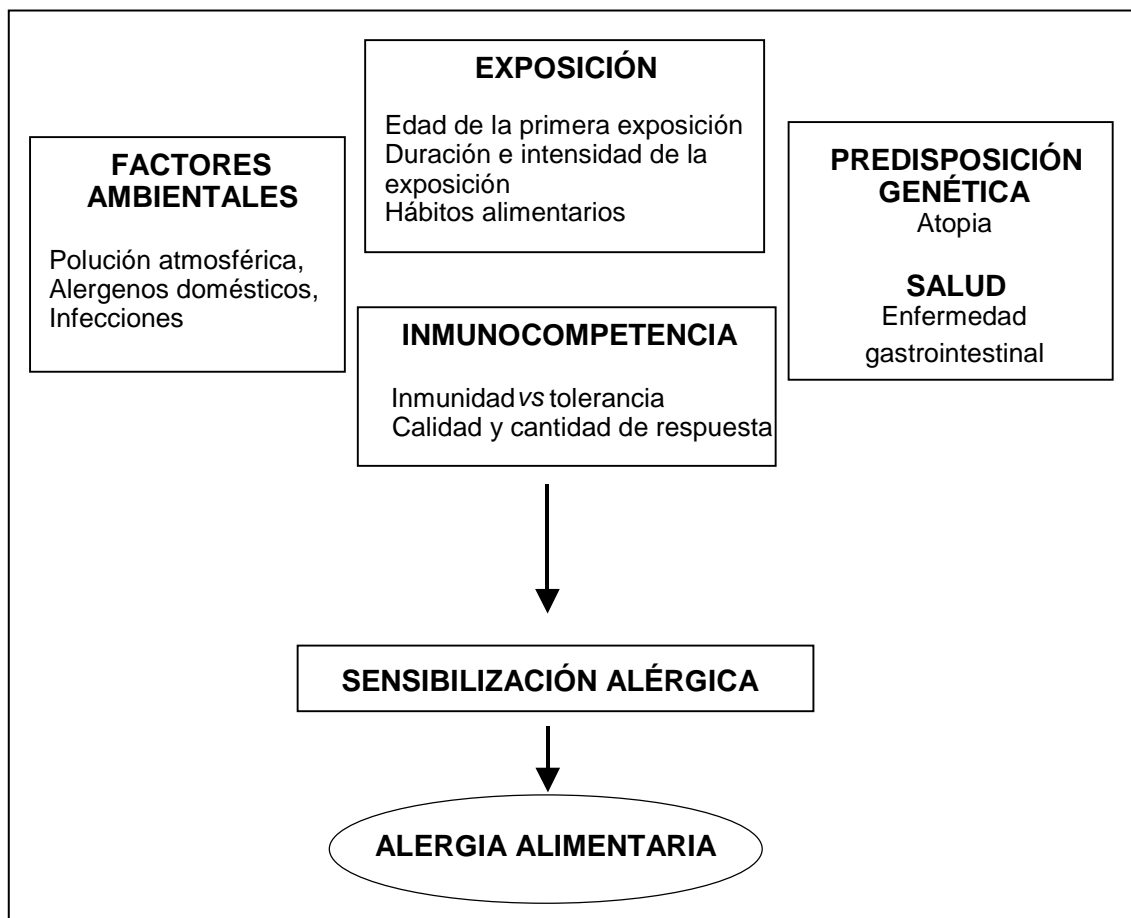
recién nacido hacia un patrón de citoquinas Th1. La exposición antigénica a la que se encuentre sometido el niño en los primeros meses de embarazo, podrá condicionar la aparición posterior de enfermedades alérgicas (Blanco-Quirós, 1998). En presencia de un antígeno, tendrá lugar una respuesta Th1 o Th2 a partir de células Th0, en función de la presencia de un tipo u otro de citoquinas en el medio (Sorensen y Porch, 2001).

El primer año de vida es el periodo más vulnerable para la sensibilización (Wahn y col., 1997). El primer contacto del sistema inmune del feto con alérgenos tiene lugar ya en el útero (Devereux y col., 2001); pequeñas cantidades de alérgeno atraviesan la placenta e inducen una respuesta específica. En los estudios sobre la proliferación de linfocitos en sangre de cordón y sangre fetal frente a Ags alimentarios y aeroalérgenos se ha indicado que el primer contacto de las células T con Ags se inicia ya en el útero (Prescott y col., 1998; Businco y col., 2001). Con este primer contacto, debido al ambiente inhibitor de linfocitos Th1, se generan linfocitos Th2, que responderán de forma específica a alérgenos y por tanto, presentarán memoria inmunológica (Blanco-Quirós, 1998). Tras el nacimiento, en contacto con diferentes alérgenos, se dan 3 posibilidades: la más común es la aparición de anergia y como consecuencia, de un estado de tolerancia o de no respuesta inmunológica; puede tener lugar también una desviación inmunológica de linfocitos Th2 hacia Th1; y por último, puede tener lugar un incremento de linfocitos Th2 previamente capacitados y sensibilizados frente a los alérgenos vía transplacentaria, y con el consiguiente desarrollo de enfermedad alérgica. Por tanto, la resistencia o sensibilidad hacia una enfermedad alérgica parece estar determinada por el balance entre aumento de los linfocitos Th2 y/o desviación hacia otros tipos de linfocitos Th durante los primeros meses de vida (Lorente y col., 2001)

La falta de maduración del sistema inmune puede verse también reflejada en la producción de citoquinas. Se ha observado que tanto en niños atópicos como no atópicos la producción de IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$  está relacionada con la edad. En niños no atópicos, menores de 2 años se ha observado la presencia de niveles de citoquinas Th2 inferiores en comparación con niños mayores también no atópicos (Smart y Kemp, 2001).

### **2.1.6.2.- FACTORES AMBIENTALES**

Aunque el componente genético juega un papel principal en las enfermedades alérgicas, la falta de concordancia de los valores de IgE y la aparición de enfermedades atópicas en gemelos idénticos de alto riesgo, implican la contribución de los factores ambientales como importantes determinantes de las enfermedades atópicas (Wühthrich y col. 1981; Warner y col., 2000). En efecto, a partir de un nivel de predisposición genética, existen múltiples factores que son responsables de la expresión final del fenotipo alérgico (Figura 4).



**FIGURA 4.** Factores condicionantes en el desarrollo de la enfermedad alérgica.

Como se ha visto anteriormente, hay distintas barreras fisiológicas que previenen de la absorción de proteínas potencialmente alergénicas. Si estas barreras sufren un deterioro, el riesgo de sensibilización aumenta. Por ello, en un individuo susceptible, la probabilidad de sensibilización dependerá de múltiples factores: permeabilidad intestinal, alergias a otros alimentos o sustancias inhaladas, inmunodeficiencias, episodios previos de

gastroenteritis viral, etc. Se ha comprobado que los individuos que presentan inmunodeficiencia tanto transitoria como prolongada, en la que se afectan IgG, IgA, células CD8<sup>+</sup>, y células T con receptor  $\gamma\delta$ , presentan mayor riesgo de desarrollar alergias alimentarias (Chandra, 1997).

#### **2.1.6.2.1.- Exposición al antígeno.**

Como ya se ha indicado anteriormente en relación con el desarrollo de la tolerancia oral o de un proceso alérgico hay múltiples factores, que además de los genéticos, pueden influir en la respuesta inmune tras el primer contacto con el antígeno. Por ejemplo, la edad a la que se produce la primera exposición al antígeno, naturaleza del mismo, dosis, frecuencia y vía de exposición (Lorente y col., 2001). Así, una exposición temprana a la leche de vaca se ha asociado a un mayor índice de sensibilización a alérgenos (Businco y col., 2001).

#### **2.1.6.2.2.- Infecciones.**

Es bien conocido el hecho de que algunas infecciones y enfermedades parasitarias predisponen a la sensibilización alérgica y favorecen la aparición de reacción alérgica. Así por ejemplo, la diarrea por rotavirus, aumenta la permeabilidad intestinal, observándose, un aumento de IgE específica a determinados alimentos tras uno de estos episodios infecciosos (Chandra, 2002). Los conocimientos en este sentido, sobre la relación entre alergia e infección están actualmente sufriendo cambios.

A pesar de la importancia de los factores ambientales como la polución, el tabaco, etc. que se ha sugerido en el notable aumento de enfermedades alérgicas acontecido en las últimas décadas, también puede estar implicado una disminución en la incidencia de infecciones. Algunos autores han propuesto que debido a una mayor higiene en la alimentación y a programas de vacunación, hay una falta de exposición a microorganismos dietéticos y ambientales, con lo que se ha reducido la frecuencia de infecciones en los países occidentales, contribuyendo por otra parte este hecho, al incremento de enfermedades atópicas. Esto constituye lo que se ha denominado "hipótesis de higiene" (Helm y Burks, 2000). Esta hipótesis afirma pues, que un mejor estándar de vida

contribuye al aumento de las enfermedades alérgicas. Y por tanto, que la protección frente al desarrollo de la atopía es mediada por las infecciones (Geha, 2000).

En este contexto, parece existir cierta relación entre el número de hermanos y la incidencia de enfermedades alérgicas. Se ha puesto de manifiesto que la prevalencia de atopía es de un 25% en sujetos sin hermanos, comparado con el 9% entre aquellos con 5 o más hermanos (Rasanen y col., 1997). La explicación vendría dada por el hecho de que los niños de familias más numerosas están en contacto con microorganismos infecciosos, especialmente bacterias, en épocas tempranas dirigiendo el equilibrio hacia Th1, probablemente inhibiendo la respuesta alérgica Th2 mediante la activación de macrófagos y células *natural killer* (NK) a la producción de IL-12 (Geha, 2000). De igual forma, se ha observado un menor número de alergopatías en poblaciones con pruebas tuberculínicas positivas (Shirakawa y col., 1997), vacunadas con BCG (Gruber y col., 1997) o después de sufrir epidemias de sarampión (Shaheen y col., 1996). Shirakawa y col. (1997) indican que la respuesta a *Micobacterium tuberculosis* presenta una correlación negativa con la presencia de enfermedad atópica en Japón. Debido a que la respuesta a la tuberculina se debe principalmente a la vacunación con BCG, estos autores pensaron en el posible efecto protector de ésta. Para ello, se hizo un seguimiento en 1314 recién nacidos hasta los 5 años analizando la IgE específica y la IgE total. Se observó una menor prevalencia de enfermedad alérgica en el grupo vacunado. Estas diferencias en la prevalencia van disminuyendo con el tiempo, no siendo ya significativas a los 60 meses de edad.

Por otra parte, el uso de antibióticos durante la infancia se ha correlacionado con un aumento del riesgo de asma (Geha, 2000). Debido a que la exposición a antibióticos produce una mayor alteración en la flora intestinal, el uso de antibióticos en la primera infancia pudiera ser un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades alérgicas. En efecto, el uso de antibióticos en las sociedades occidentales ha aumentado paralelamente con la incidencia de enfermedad alérgica (McKeever y col., 2002). El interés se centra por ello, en el efecto protector de las infecciones tempranas en el desarrollo de alergia, posiblemente a través de un efecto inhibitor de las citoquinas Th1, generadas durante la respuesta inmune en defensa frente a estas infecciones. Parece sin embargo improbable, que un estímulo potencialmente dañino tenga que ser necesario para la maduración postnatal del sistema inmune. Por lo que se ha sugerido que la primera señal para esta

maduración en la infancia temprana se deba no a microorganismos patógenos, sino a la estimulación de la propia flora microbiana (Björkstén, 1999).

En este sentido, es importante recordar el papel que juega la flora intestinal en el control de la respuesta inmune en el desarrollo del sistema inmune, y por tanto, frente a la exposición a alérgenos. Por otra parte, es interesante comprobar que la microflora intestinal de los niños con alergopatías es distinta durante el primer año de vida respecto a la de niños que no las sufren. Así, los primeros presentan menos bifidobacterias, lactobacilos y más *Staphylococcus aureus* y enterobacterias que los niños no alérgicos. Más aún, estas diferencias en la composición de la microflora se pueden comprobar en edades muy tempranas, antes de que tenga lugar la aparición de síntomas clínicos de atopía (Sepp y col., 1997; Björkstén y col., 2001).

Por otro lado, existe evidencia de que algunas infecciones y enfermedades parasitarias predisponen a la sensibilización alérgica. A su vez, la inflamación alérgica puede desencadenar infecciones en piel y mucosas cuando contribuye al daño en la barrera o a la disminución en los mecanismos de eliminación bacteriana. Así por ejemplo, la rinitis alérgica es causa de infección secundaria al producir sinusitis y otitis; las infecciones en la piel por *Staphylococcus* son una causa frecuente de complicación de la dermatitis atópica. La disminución de la IgA secretora en algunos pacientes alérgicos constituye un factor adicional (Sorensen y Porch, 2001). En múltiples ocasiones, las reinfecciones se han relacionado con la modulación de la producción de IgE y por tanto, con la sensibilización alérgica. Este hecho se debe a que la infección potencialmente estimula la producción de IgE por diferentes mecanismos: disminución de linfocitos T supresores; bloqueo beta-adrenérgico temporal; o lesión de células de la mucosa del árbol bronquial permitiendo una mayor penetración de Ags. Por el contrario, otros virus como el virus del herpes simple, influenza A y adenovirus estimulan la producción de IFN (Lorente y col., 2001).

Los estudios específicos para confirmar la “hipótesis de higiene” no son concluyentes (Strachan, 2000). Algunos resultados indican que las infecciones por sarampión (Lewis y Britton, 1998), hepatitis A (Matricardi y col., 2000) y micobacteria que reducen el riesgo de alergias, mientras que otros estudios no observan un efecto

protector en infecciones tempranas (Alm y col., 1999) o incluso muestran una correlación positiva (Vonmutius y col., 1999).

En un reciente estudio de cohorte McKeever y col. (2002) cuantifican la relación entre la exposición a infecciones de los pacientes, infecciones de sus hermanos, el uso de antibióticos y la incidencia de enfermedades alérgicas (asma, eczema y fiebre del heno). Este mismo grupo de investigación, en un estudio anterior observa un importante efecto protector en el número de hermanos mayores en el desarrollo de eczema, fiebre del heno y asma (McKeever y col., 2001). Los autores concluyen que los niños con asma son más propensos a padecer infecciones respiratorias. Resultados parecidos han mostrado que las infecciones respiratorias, principalmente por el virus respiratorio sincitial, aumentan el riesgo de padecer asma (Stein y col., 1999; Sigurs y col., 2000). No está claro si la infección respiratoria es realmente un factor de riesgo de asma o es simplemente una manifestación temprana de la enfermedad. Por otra parte, el uso de antibióticos en edades tempranas sí que podría estar relacionado con la incidencia de enfermedad alérgica. Sin embargo, no se han encontrado resultados consistentes para indicar un efecto protector de las infecciones en el niño o sus hermanos en la incidencia de enfermedad atópica (McKeever y col., 2002).

### **2.1.7.- MECANISMOS DE LA ALERGIA ALIMENTARIA**

En las reacciones alérgicas, a diferencia de las infecciosas, en un primer contacto con el antígeno no aparecen alteraciones ni síntomas. Es necesario un periodo de sensibilización, para que posteriormente, tras un segundo contacto con el alérgeno, se desencadene la respuesta inmunitaria con la aparición de los síntomas característicos.

Se han definido cuatro tipos de reacciones de hipersensibilidad en función de los mecanismos efectores que las desencadenan (Cuadro 3). Se consideran tres tipos de reacciones de hipersensibilidad mediadas por anticuerpos y un cuarto tipo, mediado principalmente por linfocitos T y macrófagos.



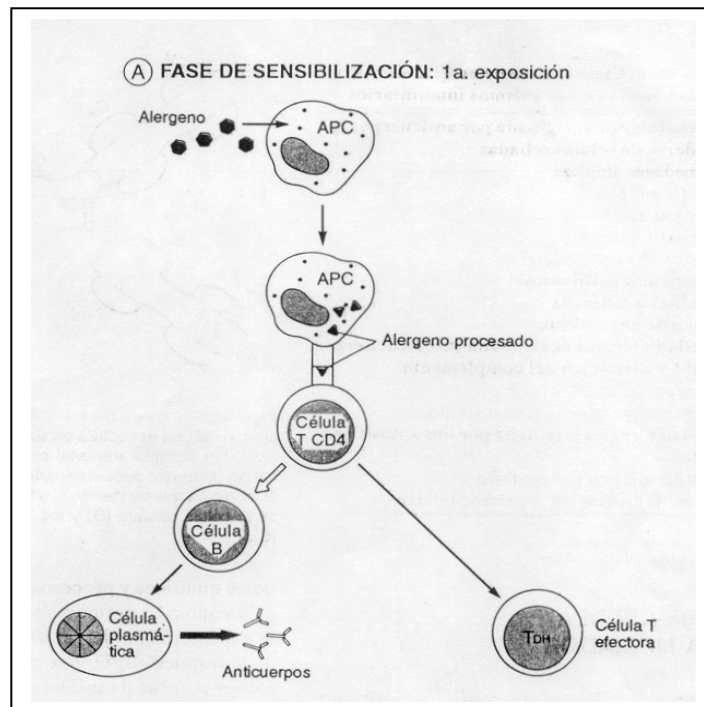
**CUADRO 3.** Clasificación de las enfermedades inmunológicas (Abbas, 2000)

Tipo de Hipersensibilidad	Mecanismo inmunitario	Mecanismo de la lesión
Tipo I: hipersensibilidad inmediata	Anticuerpos IgE	Mastocitos y sus mediadores (aminas vasoactivas, citoquinas, mediadores lipídicos)
Tipo II: mediada por anticuerpos	Anticuerpos IgM e IgG contra Ags de la superficie celular o matriz extracelular	Opsonización y fagocitosis. Activación de leucocitos
Tipo III: mediada por inmunocomplejos	Inmunocomplejos IgM e IgG contra Ags de la superficie celular o de la matriz extracelular	Activación de leucocitos
Tipo IV: mediada por células	1. Células T CD4 <sup>+</sup> (hipersensibilidad retardada) 2. CTL CD8 <sup>+</sup> (citólisis mediada por células T)	Activación de macrófagos, inflamación mediada por células

CTL = Linfocito T citotóxico

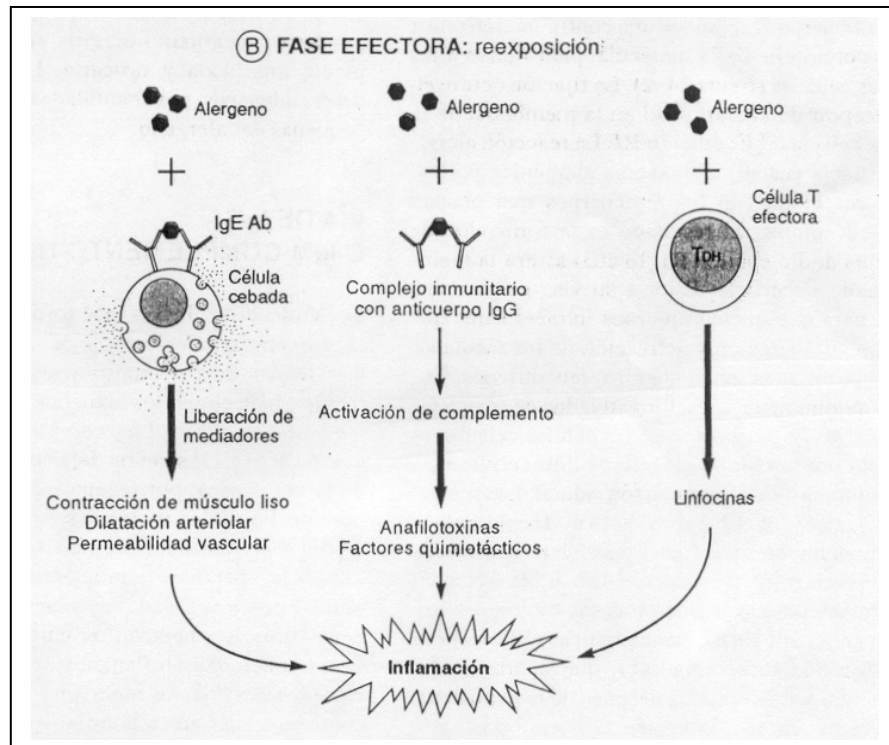
- a) **Hipersensibilidad Tipo I o inmediata**, mediada por IgE y mastocitos. Es el tipo de reacción más estudiada en las alergias alimentarias. El proceso que tiene lugar es el siguiente:

En una primera exposición al antígeno, los linfocitos B sintetizan anticuerpos IgM específicos frente al alérgeno. Este anticuerpo capta, internaliza y procesa al alérgeno. Los péptidos procesados son presentados a los linfocitos Th (CD4<sup>+</sup>) por medio de las moléculas de histocompatibilidad (MHC) tipo II. El cambio de IgM a IgE necesita de la interacción entre linfocitos B sensibilizados frente al antígeno específico y los linfocitos T. Las células T activadas secretan IL-4, y expresan ligando CD40, que actúa sobre los linfocitos B a inducir el cambio de isotipo IgM a IgE. Estas IgE se fijan sobre los receptores de alta afinidad (FcεI) de la superficie de mastocitos y basófilos localizados en esa zona, quedando así sensibilizados. Parte de la IgE pasa a circulación y se une a los receptores específicos de los basófilos circulantes y de los mastocitos tisulares que se encuentran distribuidos en distintas localizaciones como la piel, tracto gastrointestinal o pulmonar, quedando éstos también sensibilizados. Además, se generan células plasmáticas y células B memoria (Figura 5) (Terr, 1997).



**FIGURA 5.** Mecanismo alérgico: primera fase

En una segunda exposición al mismo antígeno, las células plasmáticas secretan IgE específica frente al alérgeno. Al ponerse en contacto el alérgeno con los mastocitos sensibilizados se produce un entrecruzamiento de las IgE unidas a su superficie, lo que induce un aumento de la concentración de calcio intracelular que desencadena la liberación de los mediadores preformados como la histamina, enzimas y factores quimiotácticos. Además se induce la síntesis de nuevos mediadores derivados del ácido araquidónico, concretamente, prostaglandinas y leucotrienos (Figura 6). La reacción inmediata se inicia pues, por entrecruzamiento de las IgE mediante los alérgenos. Estos mediadores son los responsables de los síntomas de la reacción alérgica de tipo inmediato. La histamina, prostaglandinas y leucotrienos desencadenan la vasodilatación, permeabilidad vascular y la contracción de la musculatura lisa. Los factores quimiotácticos atraen eosinófilos, neutrófilos y células mononucleares que liberan otros mediadores, prolongándose así la respuesta alérgica. Esto constituiría la reacción de tipo retardado, que en la mayoría de los casos sigue a la respuesta inmediata (Fuleihan, 1998; Abbas, 2001).



**FIGURA 6.** Mecanismo alérgico: segunda fase.

b) **Hipersensibilidad de Tipo II**, dependiente de anticuerpos.

En estas reacciones intervienen otros anticuerpos distintos a la IgE, tales como IgM e IgG. Algunos de estos anticuerpos son específicos de los Ags de determinadas células o de la matriz extracelular y se encuentran fijados a dichas células o tejidos, o en forma libre en la circulación. Estos anticuerpos opsonizan las células y pueden activar el complemento, conduciendo a la fagocitosis de las células. Además, pueden reclutar leucocitos (neutrófilos, macrófagos) uniéndose al receptor de Fc o activando el complemento y de esta forma liberando subproductos que son quimiotácticos para los leucocitos. Como consecuencia tiene lugar inflamación y lesión tisular. Este tipo de reacción tiene lugar, por ejemplo, en la enfermedad hemolítica del recién nacido (Abbas, 2001; Roitt, 2000).

c) **Hipersensibilidad de Tipo III**, inducida por inmunocomplejos.

Los anticuerpos pueden además, formar complejos inmunitarios solubles antígeno-anticuerpo. Estos son los responsables de las reacciones de hipersensibilidad de tipo III. Los inmunocomplejos de gran tamaño son eliminados por el sistema reticuloendotelial del

hígado, el bazo y el pulmón, mientras que los más pequeños persisten en la circulación y pueden depositarse en la membrana basal del glomérulo u otros órganos diana. Este depósito tisular puede verse favorecido por la liberación de aminas vasoactivas por parte de mastocitos y basófilos, tras la interacción simultánea de IgE y antígeno. Además, la activación del complemento por los inmunocomplejos va a estimular la quimiotaxis, la fagocitosis y la liberación de proteasas. Ejemplos clínicos en que tienen lugar estas reacciones son la enfermedad del suero y las reacciones locales de Arthus (Roitt, 2001).

Los complejos antígeno-anticuerpo se generan durante las respuestas inmunitarias normales, pero sólo causan enfermedad cuando se producen en cantidades muy elevadas, no se eliminan de forma eficiente o se depositan en los tejidos.

d) **Hipersensibilidad de Tipo IV**, de tipo celular.

Las reacciones tipo IV están mediadas por células T con especificidad antigénica y macrófagos. La reacción tiene lugar entre 24 y 72 horas después de la exposición al antígeno. Las lesiones tisulares pueden deberse a que estos linfocitos T activan los mecanismos efectores de la hipersensibilidad retardada o a que lisan directamente las células dianas.

En las reacciones de hipersensibilidad retardada, las células T CD4<sup>+</sup> (y, en ocasiones, las CD8<sup>+</sup>) responden a los Ags tisulares secretando citoquinas. Estas citoquinas ejercen funciones como activación de macrófagos, regulación linfocitaria e inducción de la inflamación, produciendo así, daño tisular.

En ciertas enfermedades, los linfocitos T citolíticos CD8<sup>+</sup> destruyen las células huésped, provocando lesión tisular.

Como ejemplos clínicos de este tipo de reacciones se encuentran la dermatitis de contacto y la respuesta injerto contra huésped.

No obstante, hay que tener en cuenta que las enfermedades inmunológicas a menudo son complejas y se deben a combinaciones de respuestas humorales y celulares y a múltiples mecanismos efectores. De hecho, en condiciones normales, un único antígeno puede estimular la respuesta inmune tanto humoral como celular.

### 2.1.8.- MANIFESTACIONES DE LA ALERGIA ALIMENTARIA

Los síntomas de la alergia/intolerancia alimentaria a las proteínas de la leche pueden aparecer entre unos pocos minutos y 1 hora tras la exposición a la leche (reacciones inmediatas principalmente mediadas por IgE) o después de 1 hora (reacciones de tipo retardado), presentándose en algunos casos síntomas incluso después de días. En la mayoría de los casos, estas últimas son reacciones no mediadas por IgE (Host, 1994). Los síntomas aparecen con mayor frecuencia a los 3-4 meses de edad (Sprickelman y col., 2000). La mayoría de los niños experimentan dos o más síntomas y síntomas en más de 2 órganos. Entre un 50-70% de niños presentan síntomas cutáneos, un 50-60% síntomas digestivos y un 20-30% de tipo respiratorio (Host, 1994; Verwimp y col., 1995; Hattevig y col., 1996).

Las manifestaciones clínicas de la alergia alimentaria pueden ser consecuencia de reacciones mediadas o no por IgE (Eigenmann y col., 1999). Por ello, se pueden clasificar en función del mecanismo inmunitario subyacente o en función del órgano afectado (Yunginger, 1998). Las manifestaciones clínicas de la alergia/intolerancia a la leche de vaca se muestran en la siguiente tabla (Cuadro 4) (Host, 1998).

**CUADRO 4.** Manifestaciones clínicas de la alergia alimentaria.

Reacciones	Mediadas por IgE	No mediadas por IgE
Gastrointestinal	Prurito bucal (OAS) Nausea, vómitos Gastroenteritis alérgica	Enterocolitis Colitis
Cutánea	Urticaria/Angioedema Dermatitis atópica	
Respiratorio	Asma Rinoconjuntivitis	Otitis media Síndrome de Heiner
Sistémico	Anafilaxia	
Otros		Migraña Irritabilidad

### 2.1.8.1.- CUTÁNEAS

#### Mediadas por IgE:

La *Urticaria* se caracteriza por lesiones eritematosas elevadas y pruriginosas de bordes serpiginosos y centros blanquecinos. Son evanescentes y de tamaño y distribución variables. La urticaria que persiste más de seis semanas se considera crónica.

El *Angioedema* es un proceso similar a la urticaria, que aparece en niveles más profundos de la dermis y tejido subcutáneo. Suele estar asociado a la urticaria, aunque en un 10% de los casos se presenta aislado. Afecta al área perioral, labios, lengua, cuero cabelludo, escroto y dorso de manos y pies. Cuando participan las vías respiratorias, surge estridor, ronquera, disnea y obstrucción, pudiendo amenazar la vida del paciente (Yunginger, 1999). Urticaria aguda o el angioedema pueden ser signos iniciales de una anafilaxia.

La *Dermatitis atópica* (DA) es una enfermedad inflamatoria crónica en la que el componente genético, los factores ambientales, farmacológicos, psicológicos e inmunológicos contribuyen al desarrollo y severidad de la enfermedad (Leung, 2000). Se trata de una afección cutánea que se caracteriza por prurito intenso de aparición constante. Se presenta de forma frecuente en la primera y segunda infancia afectando entre un 3-5 % de niños menores de 5 años (Yunginger, 1997). En efecto, la DA constituye uno de los síntomas cutáneos más comunes de la alergia a las proteínas de la leche (Isolauri y col., 1995; Novembre y Vierucci, 2001).

La causa de la DA no es del todo conocida. Se han detectado IgE específicas frente a Ags en pacientes afectados (Yunginger, 1997). Se ha observado el importante papel de los alergenios en la DA. Aproximadamente un 80% de los pacientes con DA presentan niveles séricos elevados de IgE total y específica frente a una variedad de alimentos y aeroalergenios. Así mismo, células T de lesiones cutáneas en DA proliferan y producen IL-4 *in vitro* en respuesta a Ags del polvo (Geha, 2000). Sin embargo, las concentraciones elevadas de IgE no siempre desempeñan un papel fisiopatológico; pueden estar relacionadas con alteraciones del control de la síntesis de IgE por déficit funcional de las células T supresoras (Yunginger, 1997).

En la DA, el patrón inmunológico encontrado incluye elevación de los niveles de IgE, eosinofilia, secreción espontánea de histamina, disminución del número y actividad de las células CD8<sup>+</sup>, aumento de las células Th2 productoras de IL-4 e IL-5 y bajos niveles de células secretoras de IFN- $\gamma$ , proteína catiónica eosinofílica y proteína principal básica eosinofílica (Leung, 2000).

La historia natural de la DA es variable. Generalmente la dermatitis desaparece durante los primeros años de vida, pero con frecuencia tiene lugar la aparición de enfermedades alérgicas en las vías respiratorias. Patrizi y col. (2000) tratan de establecer factores de riesgo del desarrollo de enfermedad alérgica respiratoria en niños con DA. En 78 niños con distinta severidad en los síntomas de la DA, llevan un seguimiento durante 4 años. Las pruebas *prick* test positivas, junto con los síntomas más severos de la DA y niveles elevados de IgE en suero, identifican aquellos niños entre 0-3 años con mayor riesgo de un posterior desarrollo de enfermedades alérgicas respiratorias (Patrizi y col., 2000).

Se ha comprobado que las lesiones cutáneas de la dermatitis atópica se deben tanto a reacciones mediadas por IgE como de tipo celular. Los factores inmunológicos en los que se basa esta heterogeneidad son desconocidos. En pacientes con dermatitis atópica y alergia alimentaria, la provocación oral con el alérgeno, produce reacción de tipo inmediato y/o de tipo retardado (Isolauri y col., 1997). Las reacciones de tipo retardado parecen ser más frecuentes en pacientes atópicos con resultados positivos al test cutáneo con el alimento responsable de las pruebas de provocación (Isolauri y Turjanmaa, 1996). Se han observado diferencias en la producción de IFN- $\gamma$  *in vitro* tras estimulación con el alérgeno en niños alérgicos a la leche, en función del tipo de reacción. Los niños atópicos que reaccionan de forma inmediata, producen IFN- $\gamma$ , mientras que los que responden de forma retardada, no presentan un aumento de esta citoquina (Sütas y col., 1997). Estos resultados reflejan las diferencias clínicas e inmunológicas de la dermatitis atópica.

### **2.1.8.2.- GASTROINTESTINALES**

Independientemente del mecanismo responsable, los síntomas de hipersensibilidad a nivel gastrointestinal son de naturaleza similar, pero varían en cuanto al momento de aparición, la gravedad y la persistencia (Sampson, 2000).

No mediadas por IgE:

La mayor parte de las reacciones no mediadas por IgE afectan al tracto digestivo. Los lactantes presentan en general, enterocolitis, mientras que los niños de mayor edad manifiestan con más frecuencia gastroenteritis alérgicas eosinófilas (Eigenmann y col., 1999).

La **enteropatía alérgica** o enterocolitis inducida por los alimentos es una afección intestinal de origen inmunitario no mediada por IgE y frecuentemente provocada por las proteínas de la leche de vaca o soja. Se manifiesta en forma de vómitos o diarrea tras un intervalo libre de síntomas de 4-6 horas. Las deposiciones pueden contener sangre, eosinófilos y polimorfonucleares neutrófilos. Gracias a la sustitución de la leche de vaca por leches infantiles para lactantes, la gravedad de las enteropatías alérgicas es menor (Verkasalo y col., 1981).

Las **colitis alérgica** se revela generalmente desde los primeros meses de vida por una diarrea sanguinolenta (Belli y col., 1994). La leche de vaca es el principal alérgeno responsable de esta afección no mediada por IgE y que sólo afecta al intestino grueso. Los lactantes afectados muestran frecuentemente un crecimiento y estado general satisfactorio, pero pueden tener anemia e hipoalbuminemia cuando la pérdida de sangre por el aparato digestivo es importante. La sensibilización a las proteínas de la leche de vaca puede producirse durante la lactancia, debido a la presencia de proteínas de leche de vaca en la leche materna. Frecuentemente existe un antecedente familiar de atopía. El diagnóstico es sugerido a veces por la hipoalbuminemia e hipereosinofilia en la sangre (Machida y col., 1994). La hemorragia por vía rectal desaparece en general tras 3 días de evitar el antígeno. En niños lactantes en que se sospeche una colitis alérgica, la madre deberá seguir un régimen sin leche y esperar unos días antes de reiniciar la lactancia, dejando que transcurra el tiempo necesario para que las proteínas de la leche de vaca hayan desaparecido de su propia leche. En los niños alimentados con biberón se recomienda el empleo de hidrolizados (Eigenmann y col., 1999).

Mediadas por IgE:



El *Síndrome de alergia oral*, OAS, es el equivalente mucoso de la urticaria. La ingestión de ciertos alimentos (frutas y verduras en general) se acompaña de prurito y edema de los labios, orofaringe y/o farínge laríngea (Ortolani y col., 1988).

La *Gastroenteropatía* eosinófila es una afección crónica. Se caracteriza por una eosinofilia hemática y la presencia de infiltrados inflamatorios eosinófilos en el tracto gastrointestinal. Los lactantes que presentan una enteropatía alérgica a la leche de vaca generalmente muestran una afectación de la mucosa con atrofia parcial o subtotal de las vellosidades (Katz y col., 1984).

### **2.1.8.3.- RESPIRATORIAS**

El *Asma* se define como la obstrucción reversible de las vías respiratorias de pequeño y gran calibre por hiperreactividad frente a diversos estímulos que pueden ser o no, de tipo inmunitario. El asma cursa de forma intermitente (Yunginger, 1997).

La *Rinoconjuntivitis* raramente se manifiesta en ausencia de otros síntomas alérgicos.

El *Síndrome de Heiner* se caracteriza por retraso en el crecimiento con diarrea, anemia por deficiencia en hierro y hemosiderosis pulmonar (Heiner y col., 1962). Es un tipo de hemosiderosis pulmonar que no es mediada por IgE y que según se ha sostenido, es debida a la hipersensibilidad a alimentos, principalmente a la leche (Sampson, 1995).

### **2.1.8.4.- SISTÉMICAS**

La *Anafilaxia* consiste en una reacción sistémica en la que los síntomas están relacionados con los sistemas gastrointestinal, cardiovascular, respiratorio y cutáneo. Aunque cualquier proteína es capaz de inducir reacción anafiláctica, algunos alimentos como los cacahuetes, el marisco y algunos pescados tienden a ser con más frecuencia la causa (Chandra, 1997; Sampson, 2000). La anafilaxia constituye la forma más severa de presentación de una reacción de hipersensibilidad inmediata de tipo I, dependiente de IgE. La anafilaxia debida a los alimentos es la principal causa de reacciones anafilácticas en los servicios de urgencia de los países occidentales. En USA se estima que cada año hay unos 29.000 casos tratados y unas 125-150 muertes de reacciones anafilácticas a alimentos. Los

cacahuetes, el marisco y pescados son los alimentos responsables de la mayor parte de reacciones anafilácticas graves (Sampson, 2000).

En las últimas décadas se ha observado una incidencia creciente de una forma de anafilaxia que sólo se produce al realizar ejercicio físico, la anafilaxia inducida por el ejercicio (AIE). La AIE puede deberse a una alergia subclínica que se manifiesta con la realización de un esfuerzo. Lo más frecuente es que primero se ingiera el alimento y luego se realice el ejercicio, aunque se han descrito también casos a la inversa. En general, no suelen transcurrir más de 2 horas entre ambos (Novey y col., 1984). Esta forma de anafilaxia se caracteriza por la aparición a los pocos minutos de comenzar el ejercicio, de acaloramiento y eritema difuso, seguido de prurito cutáneo generalizado. Puede acompañarse de angioedema facial, palpebral, labial, lingual o incluso laríngeo, en cuyo caso constituiría un importante compromiso respiratorio por obstrucción de las vías aéreas altas. Si el ejercicio es intenso evoluciona con frecuencia a un cuadro severo con afección gastrointestinal (vómitos, diarrea, dolor abdominal), respiratoria (broncoespasmo agudo) o cardiovascular (hipotensión), culminando en un estado de *shock* (Pérez y col., 2001).

El mecanismo por el que la actividad física condiciona la reacción al alérgeno no se conoce con exactitud, pero tras los resultados obtenidos en distintos estudios se ha especulado sobre determinados factores que pudieran estar implicados. Así, se ha sugerido que la acidosis inducida por el ejercicio puede favorecer la degranulación, hecho que se ve apoyado por estudios en los que la ingesta previa de bicarbonato impide la reaparición de los síntomas de anafilaxia tras la ingesta de trigo y la realización de ejercicio físico (Katsunuma y col., 1992). Se ha especulado además que en estos pacientes el ejercicio induce una disminución del umbral del estímulo de los mastocitos para la liberación de los mediadores de la anafilaxia (Dohi y col., 1991). También se ha sugerido como mecanismo implicado el aumento fisiológico de los opioides durante el ejercicio, que actúan como estimulantes de la degranulación de mastocitos. Lin y col. (1993) llevaron a cabo una prueba de tipo *prick* con codeína antes y después del ejercicio, comprobando que la respuesta es mayor tras el esfuerzo, lo que sugiere que el ejercicio aumenta la sensibilidad de los mastocitos ante agentes que estimulan su degranulación.

Los factores que parecen relacionarse con un mayor riesgo de presentar este tipo de reacciones sistémicas incluyen la presencia de asma, sensibilidad al marisco, los cacahuets y a otros tipos de frutos secos y el retraso en la administración de epinefrina (Sampson, 2000).

### **2.1.9.- HISTORIA NATURAL**

La historia natural de la alergia va a estar influenciada por varios factores, entre los que se encuentran el alimento responsable, el estado atópico del individuo, la edad del paciente, la presentación clínica de la enfermedad, etc. Así por ejemplo, en el caso de la los niños con alergia a las proteínas de la leche de vaca el pronóstico a largo plazo es bueno, mientras que para la alergia al huevo tiende a persistir en algunos casos hasta la adolescencia y, la alergia al pescado y los frutos secos puede durar toda la vida (Wahn, 2001). Por otra parte, en los niños que presentan eczema, síntomas gastrointestinales como vómitos, diarrea, dolores abdominales, generalmente desaparece la alergia a la leche de vaca durante el primer año de vida, mientras que en niños con urticaria, angioedema, síntomas respiratorios o anafilaxia, la alergia suele persistir en la edad adulta (Businco y Bellanti, 1993).

En la primera infancia la alergia a las proteínas de la leche de vaca (PLV) tiende a evolucionar hacia el desarrollo de la tolerancia a corto o medio plazo. Al año de vida se ha establecido la tolerancia en un 50-60% de los niños, a los dos años en el 70-75% y a los 4 años en el 85% (Host y Halcken, 1990; García-Ara y col., 1996). En España, estudios prospectivos indican que el desarrollo de tolerancia a la leche de vaca es de un 72% a los 2 años de edad, mientras que en estudios retrospectivos llevados a cabo en el mismo centro, la tolerancia fue únicamente del 50% (García-Ara y col., 1996). El seguimiento de la evolución se realiza alrededor del año, aproximadamente 6 meses tras el diagnóstico inicial. A partir de entonces se revisa al paciente de forma anual hasta los 4 años repitiéndose el estudio alérgico (pruebas cutáneas e IgE específica para leche y sus proteínas), y si no existe causa clínica que la hagan innecesaria o contraindicada, se realizará la provocación oral. A partir de los 3-4 años, el desarrollo de tolerancia es más difícil y las reevaluaciones se pueden espaciar cada 2 años. Se estima que a partir de los 10

años la alergia a proteínas de leche de vaca persiste en un 10% de los casos iniciales. La evolución de estos casos en la edad adulta es desconocida (Lebrero y col., 2001).

El mecanismo por el que unos niños desarrollan tolerancia y otros no, no es conocido. No obstante, se ha observado que los niños con alergia a la leche de vaca de sensibilización temprana, presentan mayor riesgo de padecer alergia persistente a la leche (24%). También se ha indicado en estos niños un mayor riesgo de sensibilización a otros alimentos (38%), principalmente al huevo, alergias a aeroalergenos (48%), etc. (Host y col., 1995; Aba-Alkahail y El-Gamal, 2000). Por tanto, aunque el pronóstico de recuperación frente a la alergia/intolerancia a las proteínas de la leche es bueno, el desarrollo de otras enfermedades alérgicas como asma, rinitis/conjuntivitis alérgica o intolerancias alimentaria, es frecuente (Alvarado y col., 2000; Sprickelman y col., 2000). En efecto, se ha observado que la presencia de alergia a PLV con otras alergias alimentarias es alta. En niños con alergia a las PLV no es rara la aparición de alergia a proteínas de huevo. Por ello, a veces para evitar reacciones inesperadas, se lleva a cabo un estudio alérgico a este alimento antes de su introducción y si resulta positivo, se comprueba la tolerancia clínica (Lebrero y col., 2001).

En este contexto, muchos autores han observado que las enfermedades alérgicas siguen con frecuencia una secuencia definida, conocida como “marcha alérgica”: alergia alimentaria y dermatitis atópica en la infancia, seguido de rinitis alérgica y asma. Por ello y de acuerdo con este hecho, la sensibilización temprana podría ser un factor de riesgo para una posterior sensibilización a alergenios ambientales causantes de enfermedades respiratorias (Sorensen y Porch, 2001). Sin embargo, no todos los estudios confirman este hecho. Parece ser que una aparición temprana de alergia alimentaria no es factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades. La aparición de alergia/intolerancia puede considerarse como la primera expresión del fenotipo alérgico, y no un factor de riesgo de desarrollar otras alteraciones alérgicas (Sprickelman y col., 2000).

En estudios previos se ha demostrado que los niños que posteriormente desarrollan tolerancia, presentaban niveles más bajos de IgE específica frente a la leche, en comparación con niños que se mantenían alérgicos (James y Sampson, 1992; Hill y col., 1993; Host y col., 1998). La mayor parte de los niños con reacciones alérgicas a la leche,

tanto mediadas como no por IgE, desarrollan tolerancia (Host, 1998). Sin embargo, se observa en general, una menor recuperación en los niños con reacciones mediadas por IgE que en niños con reacciones no mediadas por IgE (Bishop y col., 1990; Host y col., 1997).

Algunos estudios han señalado como indicadores de un mal pronóstico evolutivo la persistencia de alergia a leche a partir de los 4 años de edad y el mantenimiento de valores elevados de IgE sérica elevados frente a la caseína (García-Ara y col., 1996; Chatchatec y col., 2001). Sin embargo, no existe un test, aparte de las pruebas de provocación oral con leche de vaca, para determinar el posterior desarrollo de tolerancia. Sicherer y Sampson (1999) comparan los niveles de IgE específica frente a las proteínas de la leche en grupos de niños alérgicos de distinta edad, y en niños que han desarrollado tolerancia. Los niños más mayores con alergia persistente presentaron valores de IgE específica frente a la caseína mayor que los niños más pequeños (101 vs 20,2 kU/l). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la unión de IgE a proteínas de la fracción de caseína es predominante en niños mayores, con alergia persistente (Docena y col., 1996). Debido al amplio rango de solapamiento en los niveles de IgE específica, resulta difícil predecir de forma precisa qué niños desarrollan tolerancia. Sampson y Ho (1997) muestran cómo niveles de IgE específica frente a la leche inferiores a 1 kU/l presentan un valor predictivo negativo de síntomas clínicos en niños con eczema de un 90%, y un valor inferior a 0,8 kU/l de un 95%. Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Sicherer y Sampson (1999) se observa solo una tendencia hacia disminución de los valores de IgE específica al comparar antes y después del desarrollo de la tolerancia. Los autores sugieren como posible causa de la discordancia de estudios el tamaño limitante de la muestra.

### **2.1.10.- DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de las alergias alimentarias constituye uno de los puntos clave para el desarrollo de la enfermedad y el pronóstico de la misma, como sucede en la mayor parte de las patologías. Sin embargo, es de destacar que en la hipersensibilidad alimentaria, muchos casos permanecen sin diagnosticar apropiadamente y de hecho, las cifras correspondientes a la prevalencia no se consideran completamente fiables. Para el diagnóstico de las alergias alimentarias hay que seguir una serie de pasos como son el estudio de la historia clínica del paciente, la realización de unas pruebas de provocación

oral, así como la determinación de parámetros inmunológicos tanto *in vivo* como *in vitro*. De este modo, se podrá llegar a diagnosticar la causa de la sintomatología que sufre el paciente y se podrá tratar la patología de la manera más conveniente.

### **2.1.10.1.- HISTORIA CLÍNICA**

Las manifestaciones clínicas de la alergia alimentaria y de las reacciones adversas a los alimentos debidas a causas no inmunitarias, pueden ser muy similares. Por ello, una anamnesis cuidadosa y detallada, así como una completa exploración física, son importantes para el diagnóstico diferencial. El diagnóstico de la alergia alimentaria comienza pues, con un examen físico del paciente seguido de una historia clínica detallada (Sampson, 1999). Ante sospecha de alergia, el médico deberá obtener una descripción detallada sobre el momento de aparición de la reacción, alimentos ingeridos, tiempo transcurrido entre la toma del alimento y el inicio de la reacción, el tipo de síntomas (cutáneos, digestivos, respiratorios, etc.), duración de la reacción adversa y necesidad de tratamiento. También deberá informarse sobre la intolerancia a otros alimentos, sustancias inhaladas, etc. Otros datos de interés en la historia clínica son los antecedentes familiares de enfermedades alérgicas (padres, hermanos) (Martínez Gimeno y col., 2000).

Las pruebas diagnósticas de laboratorio incluyen además, *tests* tanto *in vivo* como *in vitro*.

### **2.1.10.2.- PRUEBAS DE PROVOCACIÓN ORAL**

La provocación oral consiste en la administración progresiva del alimento sospechoso para verificar si se produce una reacción adversa (Sampson, 1999). El procedimiento básico es el mismo para todas las pruebas de provocación (Bock y col., 1988). El objetivo de la provocación oral con el alérgeno es determinar si el alimento dado es responsable de una reacción. De ahí, que las pruebas de provocación oral deberán llevarse a cabo cuando el paciente no presente síntomas o más frecuentemente, cuando se haya alcanzado una estabilidad. Así los síntomas que aparezcan serán debidos con mayor probabilidad al alimento de la prueba. Por ello, las pruebas de diagnóstico deben comenzar con dietas que excluyan al alimento sospechoso, o con dietas que contengan una variedad

limitada de alimentos durante 7-14 días si se trata de enfermedad crónica como la dermatitis atópica o de hasta 3 meses para gastroenteropatías. Una vez que los síntomas han remitido completamente o al menos en un 50%, el paciente puede ser sometido a las pruebas de provocación. En el caso de no observarse mejoría significativa con las dietas de exclusión del alimento sospechoso, es probable que el alimento no sea el responsable de los síntomas. Con la introducción del alimento sospechoso, la reaparición de síntomas confirman que el alimento sospechoso es el causante de la reacción adversa. Sin embargo, para el diagnóstico diferencial de alergia/intolerancia alimentaria es necesario contar con los resultados de las pruebas de alergia llevadas a cabo en el laboratorio (Yunginger, 1997).

Dentro de las pruebas de provocación oral y en concreto, las pruebas a doble ciego controladas con placebo (DBPCFC) constituyen el “*standard de oro*” para el diagnóstico de la hipersensibilidad alimentaria. En la práctica se llevan únicamente a cabo las pruebas a simple ciego (Sicherer, 1999; Hill y col, 2001). A pesar de que las pruebas de provocación constituyen la base de confirmación del diagnóstico sobre el alimento causante de estas reacciones, sin embargo, son largas y presentan cierto riesgo (Hill y col., 2001). Por ello, para reducir su utilización, distintos grupos de investigación han estudiado la correlación de algunos parámetros con los resultados de estas pruebas. Algunos estudios han resaltado el posible valor de marcadores de sensibilización alimentaria de tipo IgE, para la identificación de niños con alergia alimentaria de tipo IgE, evitando así pruebas de provocación innecesarias. Así, Sampson y Albergo (1984) determinaron valores predictivos positivos y negativos para distintos niveles de IgE en suero frente a leche, huevo y cacahuete medidos por RAST. Los valores con RAST *score* > 3 eran comparables a los resultados del *test* cutáneo tipo *prick*. También, Hill y col. (1993) han demostrado que los valores del *prick* cutáneo de un diámetro > 6 mm son más específicos y de mayor eficacia que las pruebas RAST en la identificación de niños con alergia a las proteínas de la leche. Posteriormente, Sampson y Ho (1997) muestran que el test CAP-FEIA para leche de vaca, huevo y cacahuete es comparable con los *tests* cutáneos. De igual forma, Sporik y col. (2000) han indicado que los diámetros del *test prick* a leche, huevo y cacahuete a partir de los cuales, los niños con sospecha de alergia a estos alimentos presentan reacción adversa en las pruebas de provocación. En un estudio reciente (Hill y col., 2001) se han comparado los niveles de IgE en suero con los resultados del *test prick* cutáneo para leche,

huevo o cacahuete, en niños con sospecha de alergia alimentaria. Los sujetos con alergia severa a las PLV que no desarrollan posteriormente tolerancia, presentan altos valores en el *test prick* y de anticuerpos IgE en suero, mientras que en los que presentan síntomas de menor severidad, la enfermedad remite rápidamente, mostrando valores altos para el *test prick* pero bajos niveles de anticuerpos IgE específicos circulantes frente a la leche de vaca.

También se ha intentado determinar la posible correlación entre la respuesta a la provocación oral con cambios en la distribución de leucocitos en sangre. Se analizan la distribución leucocitaria y las subpoblaciones de linfocitos antes y 24 horas después de las provocaciones orales a doble ciego en niños con dermatitis atópica, 17 sensibles a leche o huevo y 9 niños sin sensibilización a alimentos. Se observa una disminución en el número de leucocitos y de linfocitos CD3<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup> en los niños con sensibilidad a alimentos, pero independientemente del resultado a las pruebas de provocación (Beyer y col., 1998).

Debido al riesgo de las pruebas de provocación de desencadenar reacciones severas e incluso *shock* anafiláctico, es esencial disponer de personal preparado y del material adecuado para hacer frente a reacciones de emergencia (Muraro, 2001). Las pruebas de provocación deberán de evitarse en casos de reacciones anafilácticas. Con este objeto distintos autores han tratado de identificar estos pacientes con riesgo de anafilaxis. Así, Sampson y Ho (1997) han demostrado que los pacientes de riesgo serían aquellos con niveles de IgE específica por encima del 95% del valor predictivo positivo, consiguiendo así, reducir en un 50% la necesidad de provocaciones orales para leche, huevos, pescado y cacahuete.

También en este sentido, algunos grupos de investigación están trabajando en la valoración y estandarización de técnicas para valorar la tolerancia sin tener que llevar a cabo pruebas de provocación oral. Entre estas técnicas alternativas se encuentran el *test* de contacto y la provocación labial (Rance y Dutau, 1997; Dutau, 2000).

### **2.1.10.3.- PRUEBAS INMUNOLÓGICAS**



Los estudios inmunológicos tienen por objeto establecer el posible mecanismo inmunológico que justifique biológicamente la reacción adversa.

#### **2.1.10.3.1.- Determinación de inmunoglobulina E.**

Se pueden considerar 2 "*pools*" de anticuerpos IgE. El primero, de IgE circulante, y el segundo de IgE fijada a mastocitos y basófilos. Debido a la alta afinidad de estos anticuerpos a los receptores Fcε en mastocitos y basófilos con constantes de afinidad entre  $10^9$ - $10^{10}$  M<sup>-1</sup>, el equilibrio se verá favorecido hacia su localización en los tejidos hasta llegar a la saturación, con disminución relativa de los niveles de IgE circulante (Samsoe-Jensen y Hauge-Kristensen, 1960). Durante este tiempo no estarán en relación los resultados cutáneos con los marcadores de la sensibilización IgE. Los anticuerpos IgE fijados a los tejidos podrán responder a la provocación en los órganos, tanto clínicamente como con el *test* cutáneo tipo *prick* a pesar de las bajas concentraciones de anticuerpos IgE específicos en circulación. Por tanto, es de esperar que en niños con alergia alimentaria severa tipo IgE se presenten altos niveles de IgE tanto tisular como circulante en suero; mientras que aquellos con alergia alimentaria menos severa presenten niveles bajos de IgE circulante pero altos valores de reactividad cutánea (Hill y col., 1993). Los *tests* de determinación de IgE son útiles en el diagnóstico de alergias mediadas por IgE, especialmente en los primeros estadios de la enfermedad (Dreborg, 2001).

##### **2.1.10.3.1.1.- *In vivo*: Pruebas cutáneas.**

Para el diagnóstico de los distintos tipos de enfermedades alérgicas se utilizan varios métodos de pruebas cutáneas. La prueba cutánea es una valoración sobre la presencia o ausencia de una respuesta inmunitaria a un alérgeno específico que activa un mecanismo efector determinado de inflamación y origina una lesión en la piel de tipo transitorio y visible. La piel es un órgano conveniente para el diagnóstico, ya que presenta los elementos necesarios para desencadenar una reacción alérgica localizada y controlada, aunque la enfermedad esté dirigida contra otro órgano (Terr, 1998).

##### **Pruebas de punción: Test cutáneo tipo *prick*.**

En estas pruebas se coloca una gota del extracto del alérgeno/s sospechoso/s, del control negativo (diluyente del alérgeno) y de histamina como control positivo, sobre la piel del antebrazo y se realiza una punción con lancetas especiales. La prueba cutánea tipo *prick* introduce, por tanto, en un solo punto de la dermis, una pequeña cantidad de alérgeno suficiente para reaccionar con los anticuerpos IgE fijos a las células cebadas cutáneas. Si existe IgE unida a mastocitos de la piel frente a los alérgenos, éstos se activarán y liberarán mediadores originando la llamada triple reacción de Lewis que consta de habón, eritema y prurito. La prueba se evalúa comparando el habón producido con el alérgeno y el habón debido a la histamina. Es decir, esta prueba determina la presencia de anticuerpos IgE unidos a mastocitos y su positividad sólo indica la presencia de IgE específica sobre los mastocitos de la piel (Martínez Gimeno y col., 2000).

Se pueden utilizar para estas pruebas de punción extractos comerciales del alimento y de sus proteínas. Por ejemplo, en el caso de la alergia a la leche, se emplea un preparado comercial de los alérgenos de la leche de vaca:  $\alpha$ -lactalbúmina, caseína,  $\beta$ -lactoglobulina. También puede utilizarse el alimento fresco directamente sobre la piel, como las fórmulas infantiles para niños en el diagnóstico de alergia a la leche. En este caso el método se denomina "*prick by prick*" y muchas veces es más sensible que la utilización de extractos comerciales (Bruijnzeel-Koomen y col., 1995). Un resultado positivo no siempre se asocia a síntomas; siendo esto más frecuente en adultos (Chandra, 1997). Además, en niños que han desarrollado tolerancia, a veces, la reactividad al test cutáneo persiste (falsos positivos) (David y col., 1999). A pesar del bajo valor predictivo, menor de un 50%, un resultado negativo al test cutáneo, excluye una reacción de hipersensibilidad alimentaria mediada por IgE (Bruijnzeel-Koomen y col., 1995).

Los fármacos con actividad antihistamínica deberán evitarse antes de la prueba por un periodo de 24 horas o más, según el fármaco.

### **Pruebas del parche (*Atopy Patch Test*, APT).**

En la prueba del parche, aplicando una concentración conocida del alérgeno por medio de un pequeño parche sobre la piel, se estimula la dermatitis alérgica por contacto. Es, por ello, una verdadera prueba de provocación de la enfermedad. La prueba del parche

está indicada para el diagnóstico de la dermatitis alérgica por contacto, si la causa no se descubre mediante la historia clínica (Terr, 1998). Se ha indicado que el test APT presenta un buen valor predictivo para las reacciones de tipo retardado (Niggemann y col., 2000; Roehr y col., 2001). Una respuesta positiva al *test prick* refleja reacciones tempranas (urticaria) a los Ags alimentarios (Isolaure y Turjanmaa, 1996); mientras que las pruebas del APT han mostrado eficacia en reacciones de tipo retardado (exacerbación de eczema) (Roehr y col., 2001).

#### **2.1.10.3.1.2.- *In vitro*.**

El mecanismo inmunológico puede también estudiarse mediante la determinación de la presencia de IgE específica en suero frente a los alérgenos sospechosos. La necesidad de pruebas diagnósticas *in vitro* nace del riesgo potencial de reacciones alérgicas, de las molestias y de la subjetividad de las pruebas *in vivo*. Presentan además, la ventaja del mayor número de alérgenos que pueden testarse con una toma de sangre, pero en cambio son de mayor coste que las pruebas *in vivo* (Bruijnzeel-Koomen y col., 1995).

Los *tests in vitro* miden niveles de IgE circulante, es decir, determinan sensibilización tipo IgE, que es siempre limitada. Se dispone de diversas pruebas *in vitro* para detectar estas IgE circulantes. Clásicamente se realizaba por medio de la radioalergoinmunoadsorción, RAST, basándose en isótopos. Actualmente se ha ido sustituyendo por métodos inmunoenzimáticos, sobre todo por fluoroenzimoinmunoanálisis (método CAP). Todas las pruebas *in vitro* tienen limitaciones de sensibilidad y dependen de la calidad del alérgeno y de los reactivos, así como de factores técnicos. Por ello, los resultados de cualquier prueba se deben interpretar en el contexto de historia clínica, examen físico y otros procedimientos diagnósticos (Terr, 1998).

Por otra parte, hay que considerar que hasta hace poco la dermatitis atópica y las alergias alimentarias se consideraban principalmente reacciones mediadas por IgE. Por ello, la determinación de IgE específica constituye comúnmente la base de los *tests* de diagnóstico (Host y col., 1995). En efecto, estos *tests* para la determinación de IgE específica a alérgenos sólo permiten la detección de niños con posible alergia mediada por

IgE. Pero como ya se ha mencionado anteriormente, aproximadamente la mitad de los niños con alergia a las proteínas de la leche en un estudio de cohorte, no presentan enfermedad mediada por IgE, sino de tipo celular, probablemente mejor diagnosticada mediante APT (Dreborg, 2001). Es decir, en determinadas ocasiones no se puede comprobar la presencia de IgE ni por *tests* cutáneos ni por determinación de IgE específica en suero. En los últimos años se ha observado que aproximadamente un 50% de los niños con alergia a las proteínas de la leche de vaca no presentan anticuerpos IgE específicos frente a la leche al observar los resultados del *test* cutáneo y/o por determinación de IgE específica en suero. Estos niños muestran reacciones de tipo celular, probablemente de mejor diagnóstico por medio del APT (Host y col., 1995). De la misma forma, otros estudios han observado que en niños con dermatitis atópica y alergias alimentarias, la provocación oral con el alimento produce reacción de tipo inmediato o retardado, siendo estas últimas más frecuentes en los niños con respuesta positiva al *test* del parche (Isolauri y Turjanmaa, 1996). Es decir, que no todas las alergias alimentarias en la infancia son mediadas por IgE. Sin embargo, en fase temprana de la alergia, generalmente en niños menores de 6 meses, ésta se presenta con carácter agudo de urticaria, mientras que este carácter desaparece en niños de más edad y en adultos. Por ello, se ha sugerido que la dermatitis atópica empieza con sensibilización tipo IgE y degranulación de mastocitos como mecanismo principal, reflejándose como reacción aguda. Gradualmente se va convirtiendo en reacción mediada por células T, células de Langerhans unidas a IgE específica, combinando por ello con caracteres crónicos de la dermatitis atópica. Algunos pacientes con reacciones de tipo retardado a los alimentos pueden presentar también reacciones inmediatas en las pruebas de provocación (Dreborg, 2001).

Niggemann y col. (2001) han evaluado el porcentaje de niños con pruebas de provocación oral positiva a la leche, el huevo o el trigo, pero en los que no se puede confirmar la presencia de sensibilización tipo IgE. Estudiaron las características de este subgrupo de niños, buscando además posibles marcadores predictivos. Se revisaron 208 provocaciones orales en 139 niños de edades comprendidas entre 2 meses y 11,2 años (mediana 13 meses) con sospecha de alergia alimentaria. Un 53% (111 niños) presentó reacción alérgica en las pruebas de provocación oral, siendo positivos un 47% a la leche de vaca, 34% al huevo y 19% al trigo. De este 53% con provocación oral positiva, un 89% presentó además *test* cutáneo *prick* y/o IgE específica positivas, mientras que un 11%

mostró resultados negativos tanto en el *test* cutáneo como en los valores de IgE específica en suero. Por tanto, y considerando los 3 alérgenos en su conjunto, en un 11% de niños con pruebas de provocación oral positiva no se puede demostrar la presencia de sensibilización tipo IgE. Tomando el grupo de niños con provocación oral positiva a la leche de vaca, los niños aparentemente no sensibilizados representan un 11,5%, en el caso del huevo un 2,6% y para el trigo un 23,8%.

En consecuencia, tanto los *tests* cutáneos tipo *prick* como las pruebas *in vitro* (RAST, CAP) se utilizan para determinar si un paciente presenta anticuerpos IgE específicos frente a alimentos. Aunque algunos estudios muestran cierta relación entre los resultados de las pruebas inmunológicas y de provocación oral (García-Ara y col., 2001; Hill y col., 2001) no pueden sustituirse por estas pruebas, ya que también se ha mostrado que tan sólo un 30% a un 40% de los pacientes con IgE frente a alimentos experimentan síntomas tras la ingestión del alimento. Es decir, estas pruebas son indicadoras de la presencia de anticuerpos IgE específicos frente a alimentos, pero son de baja predicción de reactividad clínica (Sampson y Ho, 1997). Por tanto, las pruebas de provocación oral deberán ser llevadas a cabo como confirmatorias del diagnóstico (Dreborg, 2001).

#### **2.1.10.3.2.- Otras pruebas diagnósticas.**

Otros mecanismos también juegan un importante papel en la patogénesis de la alergia alimentaria (Chandra y col., 1993; Sampson, 2000). Los *tests* para determinar estos mecanismos incluyen la determinación de histamina como indicativo de la degranulación de mastocitos y basófilos, evaluación de la proliferación de linfocitos, producción de citoquinas y expresión de receptor de IL-2 (Chandra y col., 1993).

##### **2.1.10.3.2.1.- Proliferación de linfocitos.**

La respuesta inmune celular ha sido menos estudiada en las enfermedades alérgicas en comparación con la respuesta humoral. Sin embargo, ya en el 1972, May y Alberto muestran respuestas proliferativas de linfocitos estimulados con leche en individuos alérgicos. Otros autores, utilizando distintas concentraciones de Ags y otros medios de

cultivo, obtienen los mismos resultados (Van Sickle y col., 1985; Baudon y col., 1987; Albani y col., 1989).

El papel de los linfocitos en las alergias se ha visto en hipersensibilidad alimentaria tanto en niños (Beyer y col., 1997) como en adultos (Werfel y col., 1997). En dermatitis atópica se observa que aquellos con empeoramiento de síntomas cutáneos tras provocación con leche, presentan mayor proliferación de linfocitos después de la estimulación con caseína, al comparar con el grupo sin exacerbación de síntomas tras provocación oral y con el grupo control. Sin embargo, no hay correlación entre el índice de estimulación y la IgE específica en suero (Reekers y col., 1996; Werfel y col., 1997).

Diversos estudios han evaluado la posible correlación entre la proliferación linfocitaria a Ags y la sintomatología. En niños con hipersensibilidad a la leche, la respuesta proliferativa a Ags alimentarios fue mayor en el grupo con dermatitis atópica sin sensibilización IgE en comparación con los que presentaban reacción inmediata (Kondo y col., 1990). Brarda y col. (1989) estudian en niños: 19 con alergia a las proteínas de la leche, 22 con alergia a otros alimentos y 15 controles sanos, la respuesta proliferativa de linfocitos antes y después de 30 días de dieta de exclusión del alimento. Únicamente, los niños alérgicos a la leche presentan antes de la dieta de eliminación, valores significativamente mayores que después de la dieta de exclusión. Estas diferencias observadas en la proliferación de linfocitos antes y después de 30 días de dieta de exclusión del alimento causante, podrían ser útiles en el diagnóstico temprano de la alergia a las proteínas de la leche. Por tanto, las pruebas de transformación linfoblástica en pacientes con alergias a distintos alimentos han sido objeto de numerosos estudios. Algunos concluyen que estas pruebas carecen de utilidad diagnóstica (Scheinmann y col., 1976; Dorion y Leung, 1994; Eigenmann y col., 1995; Higgins y col., 1995; Hoffman y col., 1997), y otros llegan a conclusiones opuestas al observar diferencias en la proliferación linfocitaria entre individuos alérgicos y controles sanos (Reekers y col., 1996; Werfel y col., 1997; Laan y col., 1998; Hourihane y col., 1998).

Se observa pues, una gran discrepancia en los resultados de los distintos estudios. Como posibles explicaciones se han sugerido: la gran variabilidad interindividual en la

proliferación linfocitaria, la ausencia de estandarización de los métodos y la diversidad de concentraciones utilizadas de los alérgenos (Sampson, 1993; Higgins y col., 1995).

#### **2.1.10.3.2.2.- Determinación de inmunoglobulina G en suero (IgG).**

La determinación de anticuerpos IgE específicos frente a los alérgenos de la leche en niños menores de 2 años, no es siempre eficaz en el diagnóstico, debido a la baja sensibilidad de la metodología actual (Duchateau y col., 1998). Por ello, se han estudiado marcadores alternativos de la hiperactividad inmunológica a Ags de la leche.

La inmunoglobulina G constituye entre el 70 y el 75 % de las reservas totales de inmunoglobulinas y es el anticuerpo de mayor importancia en las reacciones inmunitarias secundarias. Es además, el principal anticuerpo de memoria, porque persiste después de la estimulación antigénica. La IgG comprende cuatro clases (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>). Las diferentes subclases responden preferentemente a diversos Ags (Yunginger, 1997).

Calkhoven y col. (1991) encuentran una relación entre los valores de IgG específica frente a alimentos y un mayor riesgo de sensibilización posterior a aeroalérgenos. Otros estudios indican que los niños atópicos presentan valores superiores de IgG, especialmente de IgG<sub>4</sub> frente a leche y huevo que los no atópicos (Kjellman y Johansson, 1979; Jenmalm y Björkstén, 1999). En estos estudios todos los niños eran de alto riesgo de desarrollar IgE específica (por historia familiar y/o presencia de eczema). Además, para determinar si los niveles altos de IgG frente a alimentos predicen el desarrollo posterior de IgE a aeroalérgenos, son necesarios estudios longitudinales prospectivos. En este sentido, en un estudio reciente Eysink y col. (2002) evalúan en una población de niños de entre 1 y 4 años (media 28 meses) de bajo riesgo de desarrollar alergia (niveles iniciales de IgE negativos) el posible valor de los niveles de IgG frente a alimentos como valor predictivo del posterior desarrollo de anticuerpos IgE. Los autores se basan en 3 posibles explicaciones de la relación entre IgG a alimentos e IgE a aeroalérgenos. Por un lado, una deficiencia en la mucosa intestinal resulta en un aumento de la permeabilidad a macromoléculas. Además, una hiperreactividad inmunológica podría explicar esta relación y, por último, la presencia de reactividad cruzada entre alérgenos inhalados y alimentarios. De ahí que, la

respuesta primaria inmunológica frente a alimentos podría predisponer al desarrollo de alergias a aeroalergenos. En concreto observan que valores de IgG frente a trigo y a naranja pudieran ser útiles en la detección precoz de niños con mayor riesgo de desarrollar IgE.

Algunos estudios han relacionado los niveles de anticuerpos IgG frente a proteínas de la leche con la exposición en la mucosa a proteínas en niños alimentados con fórmulas infantiles, no encontrando, por tanto, relación alguna con los síntomas alérgicos. Además, no se observan diferencias entre niños sintomáticos y controles (James y Sampson, 1992). La presencia de estos anticuerpos es un fenómeno fisiológico: cuanto más corto sea el periodo de lactancia y por tanto, más temprana la introducción de fórmula adaptada, los niveles de estos anticuerpos serán más elevados (Keller y col., 1999). Sin embargo, otros autores han demostrado un valor predictivo de niveles elevados de anti-IgG frente a la BLG como indicativo de una dieta de exclusión eficiente (Casimir y col., 1993). Las causas de esta discrepancia de resultados no han sido nunca aclaradas. Por otra parte, en algunos estudios se ha demostrado una asociación entre anticuerpos IgE y IgG, atribuyendo un valor predictivo de disminución o de pérdida de la reactividad clínica al cociente IgE/IgG (Calkhoven y col., 1991). Finalmente, los pacientes con una elevada respuesta IgG frente a alergenitos alimentarios presentan mayor probabilidad de desarrollar IgE a aeroalergenos, indicando un tipo de predisposición atópica aún en ausencia de detección de IgE específica (Okuma, 1992). En otro estudio, en la mayor parte de pacientes alérgicos a la leche de vaca, no se detectaron valores de IgE, a pesar de presentar síntomas atópicos. Los autores proponen una relación entre estos pacientes que no producen IgE específica o que la producen en muy baja cantidad. Concluyen que pueden presentar alguna similitud que determine una dominancia inmunológica a nivel de anticuerpos IgG (Duchateau y col., 1998).

En 39 niños con sospecha de alergia a las PLV se determinaron los niveles séricos de IgE y de IgG frente a la leche y sus fracciones proteicas al diagnóstico y a los 12 meses. Estas determinaciones se llevaron también a cabo en 33 niños sanos como grupo control. No se observan diferencias en ningún punto en relación a la IgG y subclases entre alérgicos y controles. Dentro del grupo de niños con alergia no hay correlación entre IgE y IgG y son independientes del mecanismo que presentan: mediado por IgE (alergia) o no



(intolerancia), y de la remisión de los síntomas. Sin embargo, resulta interesante que a los 6 meses los niños con alergia vs intolerancia presentaron niveles elevados de IgE frente a las proteínas de la leche y, a los 12 meses la IgE total está aumentada en niños con alergia persistente. Por otra parte, la disminución progresiva de IgG frente ovalbúmina desde el nacimiento hasta los 6 meses, refleja la transmisión pasiva desde la madre a través de la placenta. El aumento de IgG anti-BLG pudiera deberse a una exposición temprana a proteínas de leche de vaca en todos los niños (Host y col., 1992).

Berrens y Homedes (1991) determinan IgE y IgG séricas frente a alérgenos comunes tanto alimentarios como inhalados, en pacientes alérgicos que presentaban reacción de tipo inmediata. Los resultados muestran correlación entre ambos anticuerpos frente a alérgenos. Se concluye que esta asociación pudiera deberse a la existencia de las mismas rutas en la producción de anticuerpos en individuos atópicos, o a la unión preferencial de alérgenos a inmunocomplejos IgE-IgG circulantes. Se desconoce también el valor diagnóstico exacto de la determinación de los valores de IgA e IgM específicos de Ags alimentarios que están también presentes con frecuencia en el suero de personas no alérgicas (Dannaeus, 1993; Keller y col., 1996).

En un estudio reciente Kokkonen y col. (2002) observan que la alergia a la leche de vaca con síntomas gastrointestinales presenta una relación con niveles elevados de IgG y de IgA frente a la leche y sus fracciones.

#### **2.1.10.3.2.3.- Subpoblaciones linfocitarias.**

El inmunofenotipaje de los linfocitos de la sangre o análisis de las subpoblaciones linfocitarias con anticuerpos monoclonales por citometría de flujo es muy usado en el diagnóstico de inmunodeficiencias congénitas y adquiridas.

En niños de 4-10 meses con sospecha de alergia a las proteínas de la leche se ha podido observar que los porcentajes de linfocitos B totales y de aquellos que presentan receptor de baja afinidad (marcador de activación) se encuentran elevados; mientras que el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> es inferior que en niños sanos. Por ello, estos parámetros se

podrían utilizar como posibles marcadores tempranos de la alergia alimentaria (Jarvinen y col., 1998). De igual forma, Hagendorens y col. (2000) llevan a cabo un estudio en 33 recién nacidos sanos con el fin de estudiar marcadores inmunológicos como predictivos de enfermedades alérgicas en niños. 23/33 eran niños con riesgo atópico (uno de sus padres con síntomas atópicos y valores elevados de IgE específica frente a aeroalergeno). No se observan diferencias en las subpoblaciones de linfocitos ni en la producción de citoquinas intracelulares en sangre de cordón de recién nacidos tanto de padres atópicos como de no atópicos.

En relación con pacientes asmáticos no se observan diferencias tanto en niños (7-16 años de edad) (Gemou-Engesaeth y col., 1994) como en adultos (Corrigan y col., 1993), en los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> al comparar con controles sanos de la misma edad. Tampoco se encuentran diferencias significativas en cuanto a las subpoblaciones CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> en adultos con asma alérgico o con fiebre del heno en comparación con controles sanos, a excepción de un ligero aumento de los linfocitos CD4<sup>+</sup> en el grupo de individuos con asma alérgico (Chen y col., 1996).

Ya se ha mencionado en un capítulo anterior sobre la existencia de las células T con receptores tipo  $\gamma\delta$  y su posible relación en la síntesis de IgE. Recientemente, Libero (2000) ha publicado una revisión que se centra en las características fisiológicas de los linfocitos T con receptor  $\gamma\delta$  en humanos, y en su posible implicación en distintas patologías. La localización más frecuente de las células  $\gamma\delta$ -TCR es en sangre periférica, en amígdalas y en el bazo, donde representan entre un 5-10% de los linfocitos totales y un 50-80% de las células  $\gamma\delta$  T. En el timo, órgano de maduración de los linfocitos, estas células representan solamente un 1% del total de los timocitos. En la placenta y sangre periférica de neonatos la concentración es baja, pero durante los primeros años de vida estas células se expanden y llega a ser esta última localización, en la que predominan.

Existe evidencia de que las células T con receptor  $\gamma\delta$  son capaces de reconocer Ags de tipo no peptídico, no procesados, asociados a situaciones de estrés. Además estas células son activadas por el epitelio dañado y producen factores de crecimiento epitelial y quimoquinas que atraen células inflamatorias (Zuany-Amorim y col., 1998). Asimismo se ha observado que secretan citoquinas que median la respuesta inmune tanto humoral como

celular (Ferrick y col., 1995). También se ha indicado un papel importante de las células T con  $\gamma\delta$ -TCR en el desarrollo de la tolerancia oral, nasal y ocular (Xu y Kapp, 2001).

La intervención de las células T,  $\gamma\delta$ -TCR, en la regulación de distintos compartimentos del sistema inmune así como en el reconocimiento de estrés y daño celular, evidencian el posible papel de éstas como “centinelas” del sistema inmune. Diversos estudios indican que estas células T con receptor  $\gamma\delta$  localizadas principalmente en los tejidos epiteliales, pudieran coordinar la interfase entre la inmunidad innata y la adquirida (Mak y Ferrick, 1998).

#### Relación con distintas patologías humanas

El número de células T se ve aumentado en **infecciones** por bacterias, virus y parásitos. También en pacientes con SIDA se han visto niveles elevados en sangre periférica y en pulmón. Sin embargo, no se conoce bien la causa de su expansión en las infecciones. En los pacientes con VIH pudiera ser que esta población de linfocitos contribuya a la defensa inmune frente a infecciones por microorganismos oportunistas frecuentes en estos pacientes; en “aviso” de la presencia de microorganismos en fases tempranas de la infección en las que otras poblaciones de linfocitos no han sido reclutadas. La causa de la expansión de estas células durante la infección no es bien conocida, parece ser que ejercen un efecto protector durante las infecciones. Mediante la producción de citoquinas proinflamatorias, las células  $\gamma\delta$ -TCR facilitan la activación de los macrófagos en fases tempranas de la infección (Liberio, 2000).

Tanto en enfermedades **autoinmunes** (artritis reumatoide, esclerosis múltiple) como **inflamatorias** (celíaca, enfermedad inflamatoria intestinal) se han encontrado niveles aumentados de células T  $\gamma\delta$  en distintas localizaciones; lo que sugiere una implicación en estas enfermedades. Es probable que en algunos casos los linfocitos  $\gamma\delta$ -TCR participen en la patogénesis reconociendo Ags propios. Pero también pueden inhibir las reacciones inflamatorias y facilitar el daño tisular (Liberio, 2000). Además, podrían tener un papel de control en las fases reguladores de la respuesta inmune. Tras inhalación de Ags solubles, las células  $\gamma\delta$  inhiben la producción de IgE en ratones, probablemente al bloquear la maduración de las células Th2 (McMenamin y col., 1994). De ahí su posible papel en la protección frente a la **sensibilización** por alergenios ambientales (Liberio, 2000).

Por el contrario, en estudios en ratones sensibilizados se observa que al inyectarles ovalbúmina, tiene lugar una producción de IL-4 resultando en un aumento de IgE y de IgG<sub>1</sub> en suero. Sin embargo, en ratones genéticamente deficientes en  $\gamma\delta$ -TCR, se ha observado una disminución de IgE y de IgG al comparar con los ratones normales (Zuany-Amorim y col., 1998). De los resultados de algunos estudios en animales, se sugiere que las células  $\gamma\delta$ -TCR pudieran ser responsables de la producción temprana de IL-4, generando por tanto, una respuesta Th2 que lleva a la producción de IgG<sub>1</sub> y IgE y a los síntomas de la inflamación en las vías respiratorias (Mak y Ferrick, 1998).

Se han estudiado los efectos más relevantes de las células  $\gamma\delta$  T en la inflamación alérgica relacionando las funciones biológicas de estas células y las características clínicas de la enfermedad alérgica. Existe controversia sobre el efecto inductor de CD8<sup>+</sup>. Se sabe que son potentes productores de IL-4 y IL-13, e inducen la síntesis de IgE. Por ello, pueden ser que las células  $\gamma\delta$  T ejerzan variabilidad de efectos en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación alérgica (Pawankar, 2000).

Se ha intentado correlacionar los niveles de células T tipo  $\gamma\delta$ -TCR, con eosinófilos y niveles de IgE total en suero, ambos importantes en la patogénesis de la alergia y del asma alérgico. Sin embargo, se ha observado una disminución de las células T tipo  $\gamma\delta$ -TCR tanto en porcentaje, desde un 4,1% en el grupo control a un 3,2% en alérgicos y un 2,4% en asmáticos; como en valores absolutos  $91,8 \times 10^3/\text{ml}$  en individuos sanos a un  $47,8 \times 10^3/\text{ml}$  en asma alérgico, sin encontrar correlación con los valores de IgE sérica total (Chen y col., 1996). Del mismo modo, Krejsek y col. (1998) encuentran los niveles de células T con receptor  $\gamma\delta$  disminuidos en adultos asmáticos.

En otros estudios no se confirman estas diferencias en porcentaje, fenotipo ni estados de activación de las células T con receptor  $\gamma\delta$  en sangre periférica de pacientes con rinitis alérgica (Pawankar y col., 1996; Molfino y col., 1996). Estos resultados sugieren que las células  $\gamma\delta$ -TCR de la mucosa difieren de las de sangre periférica, indicándose una expansión de estas en la mucosa de pacientes con rinitis atópica y asma. En niños con dermatitis atópica también se han observado valores disminuidos de  $\gamma\delta$ -TCR en relación

con niños sanos; presentando además, este grupo porcentajes inferiores de células CD8<sup>+</sup>, con receptor  $\gamma\delta$  (Schauer y col., 1991).

En relación a las células asesinas naturales (*natural killer*, NK), constituyen una población de linfocitos con importante actividad citolítica y variedad de funciones diversas, incluyendo regulación de la hematopoyesis, funciones supresoras y producción de inmunoglobulinas (Gray y Horwitz, 1995). Estas células NK no presentan el receptor de las células T, TCR, pero comparten otros caracteres con estas células T, como la expresión de moléculas de superficie y secreción de las mismas citoquinas (Ortaldo y col., 1986). En 26 adultos con asma de difícil control y 22 pacientes con asma leve se observan valores mas elevados de NK comparados con controles sanos (Krejsek y col., 1998).

#### **2.1.10.3.2.4.- Determinación de la producción de citoquinas.**

Las citoquinas son proteínas secretadas por las células de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa que median muchas de las funciones de estas células. Las citoquinas se producen en respuesta a microorganismos y otros Ags, y estimulan diferentes respuestas de las células implicadas en la inmunidad y la inflamación. En la fase de activación de la respuesta inmune, las citoquinas estimulan el crecimiento y diferenciación de los linfocitos, mientras que en las fases efectoras de la inmunidad, activan diferentes células efectoras para que eliminen otros Ags. La nomenclatura de las citoquinas se basa a menudo en sus fuentes celulares. Así, las citoquinas producidas por fagocitos mononucleares reciben el nombre de monoquinas, y las producidas por linfocitos se denominan linfoquinas. Sin embargo, con el desarrollo de la clonación molecular, se ha observado que la misma proteína puede ser sintetizada por linfocitos, monocitos y diversas células tisulares, por lo que el término genérico citoquinas se utiliza para referirnos a todo esta clase de mediadores (Abbas, 2001).

Como ya se ha mencionado con anterioridad, las reacciones de hipersensibilidad inmediata (tipo I) no caracterizan todos los casos de alergia a las proteínas de la leche de vaca. Muchos pacientes muestran síntomas de hipersensibilidad retardada, mediada por células T (tipo IV). Por ello, la determinación de la producción de citoquinas por linfocitos

estimulados con el alérgeno alimentario causante de sensibilización, puede ayudar también a entender el papel de la inmunidad celular en las alergias alimentarias. En este sentido, algunos estudios han observado que los niños alérgicos presentan un patrón de citoquinas tipo Th2, con baja producción de IFN- $\gamma$ , y mayores niveles de IL-4 que los controles sanos (De Jong y col., 1996; Noma y col., 1996; Beyer y col., 1997).

La determinación de citoquinas en sangre y tejidos se lleva a cabo de forma frecuente en investigación clínica. También se analizan los niveles de citoquinas en estudios sobre la implicación del sistema inmune en la patogénesis de la dermatitis atópica (Niwa y col., 2000).

El cociente Th1/Th2 (o proinflamatorias vs. antiinflamatorias) resulta de utilidad para caracterizar diversas enfermedades alérgicas como el asma atópico (Kenyon y col., 2000) y la alergia al polen (Moverare y col., 2000).

A continuación se exponen las principales características y funciones biológicas de algunas citoquinas:

### **Interleuquina 2 (IL-2)**

La IL-2 es un factor de crecimiento para los linfocitos T estimulados por el antígeno, actuando principalmente sobre las mismas células que la producen (factor de crecimiento autocrino). La IL-2 es producida por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y, en menor medida, por las células T CD8<sup>+</sup>. La activación de las células T por Ags estimula la transcripción del gen de la IL-2 y la síntesis y secreción de esta proteína. La producción de IL-2 es transitoria, con una secreción máxima a las 8-12 horas después de la activación. La estimulación crónica de las células T provoca la liberación del receptor de IL-2, IL-2R. Desde el punto de vista clínico, un aumento del nivel de IL-2R liberado en el suero es un marcador de una estimulación antigénica potente (Abbas, 2001).

La IL-2 desempeña importantes funciones en la inmunidad adaptativa: producida por las células T tras el reconocimiento del antígeno, es responsable de la proliferación de las células específicas del antígeno. Estimula también la proliferación y diferenciación de

otras células inmunitarias y, potencia la muerte por apoptosis de las células T activadas por el antígeno (Sánchez-Pérez, 1998).

Los niveles séricos de IL-2 en niños con dermatitis atópica con sensibilidad alimentaria son superiores que en niños sanos. Las diferencias son especialmente mayores en aquellos niños con mayor gravedad de lesión cutánea. Esto sugiere que la producción de IL-2 pudiera jugar un papel importante en la patogénesis de las lesiones cutáneas (Szczepanski y Kaczmarek, 1995).

### **Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )**

También llamado IFN tipo II o IFN inmunitario como diferenciación de los otros tipos de interferones predominantemente antivirales (tipo I). El IFN- $\gamma$  es secretado por casi todos los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, por algunos CD4<sup>+</sup>, particularmente los del subgrupo Th1 y, en menor grado por las células asesinas naturales, ó células NK. Como los otros interferones, el IFN- $\gamma$  presenta efecto antiviral. Es además, el principal activador de macrófagos; y activa también neutrófilos y células NK. El IFN- $\gamma$  aumenta la actividad de las células Th1 y, por tanto, de la inmunidad mediada por células; sin embargo, impide la proliferación de células Th2, inhibiendo así, la inmunidad humoral (Oppenheim y col., 1997).

### **Interleuquina 4 (IL-4)**

La IL-4 es producida principalmente por linfocitos T CD4<sup>+</sup> de la subpoblación Th2, así como por basófilos y mastocitos activados. Presenta múltiples acciones biológicas, dirigidas a la inducción de reacciones mediadas por IgE y por mastocitos/eosinófilos y a inhibir reacciones dependientes de macrófagos. Estimula el cambio de la cadena pesada de las inmunoglobulinas de las células B al isotipo IgE. Los anticuerpos IgE intervienen en la defensa mediada por eosinófilos frente a las infecciones por helmintos y artrópodos. Además, y como ya se ha mostrado en apartados anteriores con detalle, la IgE es el principal mediador de las reacciones de hipersensibilidad inmediata, y por tanto, la producción de IL-4 es de gran importancia en el desarrollo de alergias. Estimula el desarrollo de células Th2 a partir de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes y actúa como factor de crecimiento autocrino para las células Th2 diferenciadas. Por último, esta citoquina

antagoniza los efectos de activación de los macrófagos del IFN- $\gamma$ , inhibiendo las reacciones de la inmunidad celular (Abbas, 2001).

El estado atópico se caracteriza por una falta de equilibrio Th1/Th2, con una producción *in vitro* elevada de IL-4, y disminuida de IFN- $\gamma$  tanto en niños como en adultos (Tang y col., 1995). Se ha postulado que una elevada producción de IL-4 promueve el desarrollo de hipersensibilidad mediada por IgE, mientras que la combinación de producción elevada de IL-4 y disminuida de IFN- $\gamma$  promueve la aparición de desórdenes atópicos como la DA y el asma (Campbell y col., 1998).

Tang y Kemp (1995) estudian la producción de IL-4 por células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA en recién nacidos, niños y adultos, observando valores inferiores en recién nacidos y niños menores de 10 años al comparar con adultos. Se ha demostrado que la presencia de IL-4 en suero está asociada con el desarrollo de enfermedad alérgica en la infancia (Borres y col., 1995), incluso estos niveles están ya elevados antes de aparecer los síntomas clínicos, por lo que se sugiere que la enfermedad atópica está asociada con un desorden funcional en las células T.

En niños con DA y sospecha de alergia a la leche/huevo con edades entre los 5 meses y los 10 años (media = 3,2 años) se observa que tras la estimulación *in vitro* con mitógeno, los niveles de IL-4 están incrementados mientras que los de IFN- $\gamma$  se encuentran disminuidos en comparación con el grupo control de niños no atópicos (n=6). No se observan diferencias en la producción de citoquinas en relación a los síntomas tras la provocación oral (Beyer y col., 1998).

En algunos estudios no se ha detectado producción de IL-4 en niños alérgicos a la leche de vaca ni en controles sanos (Osterlund y col., 1999). En niños con DA, tampoco se detecta esta citoquina en sobrenadantes de cultivo tras estimulación con leche o sin estimular (sensibilidad del test 2,3 pg/ml). Solamente en cultivos estimulados con ConA se detecta IL-4 pero sin observar diferencias entre los grupos (Sütas y col., 1997).

### **Interleuquina 5 (IL-5)**



La interleuquina 5 es secretada por eosinófilos, mastocitos y por linfocitos T activados (Lorentz y col., 1999). La principal función de la IL-5 en los seres humanos consiste en estimular la producción de eosinófilos. Actúa aumentando, tanto el número de eosinófilos como su función. La IL-5 juega un importante papel en la infiltración de eosinófilos inducida por Ags en piel, pulmón y a nivel intestinal. Es posible que la IL-5 sea pues, responsable de la inducción de eosinófilos en el intestino y la inflamación posterior que tiene lugar en la alergia alimentaria (Bae y col., 1999).

Estudios *in vivo* han demostrado claramente que la IL-5 es la principal citoquina reguladora de la eosinofilia presente en infecciones por helmintos y en enfermedades alérgicas. Por otra parte se sabe que esta citoquina aumenta la actividad de los basófilos preparándolos para liberar mediadores del tipo de la histamina y leucotrienos, como respuesta a otras señales (Openheim y col., 1997). En niños con alergia a la leche, se detectan niveles de IL-5 en suero que se hacen indetectables tras 2 semanas con dieta de exclusión de leche de vaca y coincidiendo también con la remisión de síntomas (Matsumoto y col., 1999).

En niños con alergia al huevo (6 meses – 5 años), la pérdida de reactividad se asocia con una producción *in vitro* nula de IL-5 y de proliferación de linfocitos tras estimulación con ovalbúmina (Ng y col., 2002).

### **Interleuquina (IL-10)**

Es una proteína de Pm de 18kD, producida por los linfocitos Th2, células T CD8<sup>+</sup>, monocitos y células B activadas. Originalmente se denominó factor inhibidor de la síntesis de citoquina debido a su propiedad de inhibir la producción de citoquinas por linfocitos T activados. En concreto, la IL-10 inhibe la producción de citoquinas como la IL-2 y el IFN- $\gamma$ , por parte de células Th1. Dirige, por tanto, el equilibrio regulador a favor de las respuestas inmunitarias humorales (Oppenheimer, 2000). Es una citoquina anti-inflamatoria que estimula la producción de IL-1ra por las células presentadoras de antígeno (APC), inhibe la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-6, IL-2, IFN- $\gamma$ , por células T y APC (Borish, 1998) y actúa inhibiendo la inflamación cutánea (Berg y col., 1995).

Sütas y col. (2000) evalúan el posible efecto del perfil de citoquinas (antiinflamatorias/proinflamatorias) circulantes sobre las diferencias clínicas e inmunológicas en niños (edad media = 15 meses) con dermatitis atópica y alergia alimentaria. En los pacientes alérgicos, los valores de IgE total se correlacionan con la IL-10 en suero. Los resultados muestran el efecto estimulante de la exposición oral al alérgeno sobre los niveles sistémicos de IL-10. Por otra parte, se asocia el papel de la IL-10 con reacciones de tipo retardado en pacientes con dermatitis atópica y alergia alimentaria. La frecuencia de células que secretan de forma espontánea IL-10 es superior en niños con alergia a la leche o con enteropatía a las proteínas de la leche que en controles sanos (Hauer y col., 1997).

Se ha detectado una disminución de los niveles de IL-10 en lágrima de pacientes adultos con aeroalergia en comparación con sujetos sanos. Se ha relacionado este resultado con el aumento en el cociente citoquinas proinflamatorias/IL-10. Estos niveles reducidos de IL-10, podrían contribuir a explicar la patofisiología de la inflamación alérgica (Cook y col., 2001).

Sin embargo, en niños con alergia al huevo (n = 46) o que han desarrollado tolerancia (n = 13), la producción elevada de IL-10 y de IFN- $\gamma$  tras estimulación con ovalbúmina (OVA), se asocia con el desarrollo de tolerancia. Por ello, se ha sugerido un mecanismo de regulación persistente por parte de estas células T, específicas frente a OVA, más que por un mecanismo de delección clonal de estas células T específicas (Ng y col., 2002).

### **Interleuquina (IL-1)**

La principal fuente celular de IL-1, al igual que del TNF es el fagocito mononuclear activado. Pero a diferencia del TNF, la IL-1 también puede ser producida por muchos tipos celulares como los neutrófilos, las células epiteliales y endoteliales, etc. Hay 2 formas de IL-1, llamadas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que aunque muestran una homología entre sí inferior al 30%, se unen a los mismos receptores de superficie y median las mismas actividades biológicas. La mayor parte de IL-1 presente en la circulación es IL-1 $\beta$ .

Los efectos biológicos de la IL-1 son similares a los del TNF y dependen de la cantidad de citoquina producida. A bajas concentraciones actúa como mediador de la inflamación local; mientras que si se secreta en cantidades mayores, entra en la circulación y ejerce efectos endocrinos. La IL-1 sistémica comparte con el TNF la capacidad de producir fiebre y de inducir la síntesis hepática de proteínas plasmáticas de fase aguda e iniciar el deterioro metabólico (caquexia). Su principal función es mediar la respuesta inflamatoria frente a las infecciones y otros estímulos inflamatorios (Roitt, 2002).

La producción de citoquinas proinflamatorias por las células Th es esencial para la inducción y el mantenimiento de la inflamación alérgica. Se ha puesto de manifiesto que la inmunoterapia induce una disminución de la reacción alérgica inflamatoria al comprobar una reducción de los niveles séricos de IL-1 y de TNF- $\alpha$  tras inmunoterapia en pacientes con rinitis o asma alérgico estacional. Se han observado niveles más altos de IL-1 y TNF- $\alpha$  y más bajos de IL-2 en suero, en adultos (n=11) con rinitis alérgica estacional frente a controles sanos (n=6) (De Amici y col., 2001). Así mismo, Verhaeghe y col. (2002) muestran niveles elevados de IL-1 $\beta$  en las secreciones nasales de pacientes con rinitis alérgica estacional que aumentan tras exposición al polen en comparación con los niveles basales. Además, estos niveles se mantienen elevados hasta 4 semanas después de la estación polínica.

### **Interleuquina (IL-6)**

La IL-6 es una citoquina que actúa en la inmunidad innata y en la adaptativa. Es sintetizada por los fagocitos mononucleares, las células endoteliales vasculares, fibroblastos y otras células, en respuesta a microorganismos y a otras citoquinas, principalmente la IL-1 y el TNF. Sin embargo, presenta acciones biológicas diferentes a estas dos citoquinas. En la inmunidad innata, estimula la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos, contribuyendo así a los efectos sistémicos de la inflamación, la denominada respuesta de fase aguda. Es el inductor más importante de la respuesta de fase aguda hepática, compartiendo esta actividad con la IL-11, IL-1 y el TNF. En la inmunidad adaptativa, la IL-6 estimula el crecimiento de los linfocitos B que se han diferenciado en células productoras de anticuerpos (Roitt, 2001).

### **Factor de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factor*, TNF)**

El TNF- $\alpha$  se produce de modo predominante por linfocitos T y macrófagos activados, y en menor grado por otros tipos celulares. Su principal función fisiológica es la estimulación del reclutamiento de neutrófilos y monocitos en los focos de infección y la activación de estas células para erradicar microorganismos. Sus acciones dependen de la concentración. En concentraciones bajas, el TNF actúa sobre los leucocitos y el endotelio induciendo inflamación aguda; en concentraciones moderadas, media los efectos sistémicos de la inflamación y si se trata de altas concentraciones causa alteraciones patológicas del *shock* séptico (Abbas, 2001).

Tanto TNF- $\alpha$  como TNF- $\beta$  se fijan ambos a los mismos receptores en las células diana, y en consecuencia tienen las mismas actividades biológicas. Estas actividades se superponen de manera extensa a las de la IL-1 (Oppenheim y col. 1997). La inducción natural de TNF ejerce un efecto protector, pero una sobreproducción puede ser perjudicial. Se ha observado que el TNF actúa favoreciendo la diferenciación de las células dendríticas inmaduras a otras más maduras con mayor capacidad de presentación de Ags (Sallusto y col., 1995; Loré y col., 1998).

Así, una producción óptima de TNF- $\alpha$  parece ser importante en la regulación de la función de los linfocitos T y macrófagos; mientras que a falta del mismo, podría afectarse de manera importante en el niño, el desarrollo y mantenimiento de la tolerancia oral a Ags alimentarios (Sallusto y col., 1995). En otras palabras, si debido a una baja producción de TNF- $\alpha$ , la función de las células T está disminuida o inducida únicamente de forma débil, la exposición en el niño a proteínas extrañas, pudiera causar reacción inflamatoria local o sistémica. En base a este hecho, Osterlund y col. (1999) estudiaron la posible alteración de leucocitos productores de TNF- $\alpha$  en niños con alergia a la leche de vaca. Para ello, evaluaron *in vitro* la capacidad de las células mononucleares de sangre periférica para producir TNF- $\alpha$  en niños (media de edad de 3,2 meses) con alergia a la leche (n = 32) o en controles sanos (n = 12). Esta producción de TNF- $\alpha$  así como de IFN- $\gamma$ , fue menor en niños con alergia a las proteínas de la leche que en controles sanos. La función de las células productoras de TNF es deficiente, por lo que los autores sugieren un papel del

TNF- $\alpha$  en la inducción de la tolerancia oral (Osterlund, 1999). Sin embargo, Matsumoto y col. (1999) no encuentran diferencias en la producción *in vitro* de TNF- $\alpha$  tras estimulación con leche, entre niños que han presentado anafilaxia a la leche y niños no alérgicos.

No obstante, al medir los niveles de TNF- $\alpha$  en suero en niños con DA, se ha observado un aumento en la concentración de TNF- $\alpha$  que se correlaciona con la severidad de la dermatitis (Pellegrino y col., 1996).

A pesar del gran avance en los conocimientos del papel de las reacciones de tipo celular y mediadas por IgE de los últimos años, ningún *test* de laboratorio, *in vivo* o *in vitro* es diagnóstico de las alergias alimentarias (Muraro, 2001). Los *tests* cutáneos se caracterizan por tener valor predictivo negativo alto pero bajo valor predictivo positivo. A veces, un resultado positivo no está acompañado de síntomas. La determinación de IgE específica *in vitro* presenta también elevada especificidad y valor predictivo negativo pero baja sensibilidad y bajo valor predictivo positivo (Sampson y Albergo, 1984). En cuanto a la determinación de la inmunidad celular, a pesar de los numerosos estudios llevados a cabo, los resultados son a veces contradictorios.

## **2.1.11. TRATAMIENTO**

### **2.1.11.1.- DIETAS DE EXCLUSIÓN**

Una vez establecido el diagnóstico de alergia alimentaria, la exclusión del alimento responsable, manteniendo los requerimientos nutricionales, es en la actualidad, el único tratamiento apropiado para prevenir futuras reacciones (Eigenmann y col., 1999). Los intentos de controlar los síntomas de alergia a alimentos con medicación (cromoglicato disódico) no han sido eficaces, por lo que las medidas dietarias, con la introducción de algún tipo de dieta, constituye el tratamiento de elección (Wahn, 2001).

La exclusión estricta de determinados alimentos es muy difícil, especialmente cuando el alérgeno forma parte de un preparado comercial (Steinman, 1996; Burks y col., 2001). La intervención dietética más fácil consiste en sustituir el componente del alimento responsable de la alergia por otra fuente proteica que sea aceptada por el niño y que

asegure un adecuado aporte nutricional. En el caso de la alergia a las proteínas de la leche de vaca, un ejemplo lo constituye la sustitución de la leche de vaca por proteínas de soja de sabor muy aceptado. Otros sustitutos como la leche de cabra, de caballo, etc. pueden reaccionar de forma cruzada con las proteínas de la leche o, pueden ser nutricionalmente incompletas, por lo que requieren suplementación. En casos excepcionales, los niños que sean altamente sensibles pueden presentar síntomas frente a cantidades mínimas de proteínas sin digerir en los hidrolizados. En estos casos el uso de aminoácidos es apropiado y su seguridad ha sido comprobada mediante estudios longitudinales (Wahn, 2001).

Es importante considerar qué alérgenos de distintos alimentos (leche de vaca, huevo) se pueden encontrar de forma enmascarada en algún preparado alimenticio. Por ejemplo, la caseína se utiliza en la elaboración de otros alimentos, como productos derivados del cerdo (jamón curado, salchichas, salami, etc.), mosto de uva sin fermentar, horchata de chufa, otros zumos de fruta y bebidas alcohólicas (vino, licores, cerveza, bebidas alcohólicas naturales, champán, etc.). Por este motivo, en una dieta de eliminación para pacientes que sufran ataques agudos tras consumir productos que contengan caseína, se deberían excluir muchos alimentos además de la leche de vaca y de los productos derivados (Businco y col., 2001).

### **2.1.11.2.- FÓRMULAS INFANTILES**

En el momento actual existe una gran variedad de fórmulas infantiles, con proteínas de distinto origen y grado de hidrólisis. Los productos de segunda generación son fórmulas de alergenidad altamente reducida, en la que las proteínas están hidrolizadas, pero sin cambios en los lípidos y los carbohidratos. Los hidrolizados a base de proteínas del suero y de caseína son los de elección en niños con alergia/intolerancia (Chandra y Hamed, 1991; ESPGAN, 1993).

Existen tres tipos de fórmulas infantiles que pueden ser utilizadas como sustitutivas de la leche de vaca: los hidrolizados proteicos, las fórmulas de soja y las dietas elementales.

### 2.1.11.2.1.- Hidrolizados proteicos.

Existen 2 tipos: de alto grado de hidrólisis (FH) y de bajo grado de hidrólisis o parcialmente hidrolizadas (HA).

#### 1) Alto grado de hidrólisis.

Sus proteínas han sufrido un alto grado de hidrólisis mediante técnicas diversas: calor, tratamiento enzimático, combinación de las anteriores, ultrafiltración. Los pesos moleculares de sus péptidos oscilan entre 15-30 kDa. Pueden estar contaminadas en distinto grado por proteínas nativas, no garantizándose la ausencia de reactividad en niños muy sensibles. Además, el que se trate de péptidos de bajo peso molecular no supone alergenicidad nula. De ahí, su denominación de fórmulas hipoalergénicas, haciendo referencia a su alergenicidad residual (Rueda Esteban y col., 2000).

#### 2) Bajo grado de hidrólisis.

Han sufrido una hidrólisis parcial de las proteínas: péptidos de peso molecular elevados (10-20 kDa), por lo que sólo han perdido parte de su capacidad antigénica. Se utilizan en la prevención de reacciones adversas a las proteínas de la leche de vaca en recién nacidos y lactantes cuando la lactancia materna no es posible (Rueda Esteban y col., 2000).

Partiendo del hecho de que ninguna fórmula hidrolizada es completamente segura, la Academia Americana de Pediatría y la Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición (ESPGAN) recomiendan llevar a cabo *tests* de provocación oral a doble ciego y comprobar que estas fórmulas son toleradas al menos en un 90% de niños con alergia confirmada a las proteínas de la leche (Giampietro y col., 2001).

En un estudio reciente se confirma que un pequeño número de niños reacciona a fórmulas altamente hidrolizadas. Las pruebas cutáneas previas pueden indicar si el niño presenta riesgo de reacción ante el producto. Sin embargo, en este estudio la mayor parte de los niños con pruebas cutáneas positivas sí toleran las fórmulas altamente hidrolizadas a base de proteínas del suero (Giampietro y col., 2001).

#### **2.1.11.2.2. - Fórmulas a base de soja.**

Como ya se ha mencionado anteriormente, estas fórmulas pueden inducir sensibilidad (Wahn, 2001). Aunque hay estudios que no defienden esta idea (Klemola y col., 2002), la leche de soja no es utilizada en la prevención de la alergia a las proteínas de leche, y no son estas fórmulas de primera elección en el tratamiento de estas alergias (Wahn, 2001).

Por otra parte, teniendo en cuenta que los mecanismos de defensa de la barrera intestinal dependen de la edad y que se alteran por procesos como la gastroenteritis aguda (Kokkonen y col., 1979), la utilización de fórmulas de soja en lactantes con intolerancia a las proteínas en niños menores de 6 meses no es prudente y ha sido muy debatida por el posible aumento del riesgo de sensibilización (Rueda Esteban y col., 2000; Wahn, 2001). Pasados 6 meses y cuando los síntomas gastrointestinales han desaparecido, las fórmulas de soja son una alternativa a las FH, aunque deben ser utilizadas con prudencia (Rueda Esteban y col., 2000).

#### **2.1.11.2.3.- Dietas elementales.**

Son fórmulas a base de L-aminoácidos, polímeros de glucosa y aceites vegetales. Su capacidad sensibilizante es teóricamente nula. Su uso está indicado en pacientes en los que las fórmulas anteriores hayan fracasado. Estas fórmulas deberán de llevar un suplemento de calcio, oligoelementos y vitaminas (Vitoria y col., 1995).

#### **2.1.11.3.- DESENSIBILIZACIÓN**

La inmunoterapia se lleva utilizando de manera extensa y eficaz en el tratamiento de alergias a aeroalergenos como en rinitis alérgica y en asma alérgico. En efecto, la inmunoterapia específica se utiliza de forma habitual desde hace casi un siglo para el tratamiento de enfermedades alérgicas respiratorias y en alergias a venenos de insectos (Abramson y col., 2000).



Debido a la eficacia de los protocolos de sensibilización en las alergias vía inhalatoria, algunos investigadores han estudiado la posible aplicación de la inmunoterapia en el tratamiento de las alergias alimentarias. Los cacahuets y el marisco serían candidatos ideales, dado que en este tipo de alergias no se suele desarrollar tolerancia. Por ello, en diversos estudios se han llevado a cabo protocolos para la desensibilización en pacientes con reacciones anafilácticas graves a alimentos (Nelson y col., 1997; Patriarca y col., 1998; Bauer y col., 1999; Nucera y col., 2000).

Así, Patriarca y col. (1998) llevan a cabo un protocolo de sensibilización oral en 14 niños con distintas alergias a alimentos (6 a leche, 5 al huevo, 2 al pescado, 1 a manzana) y comparar sus efectos con los de un grupo control de 10 niños con alergias a estos alimentos y sometidos únicamente a dietas estrictas de exclusión. El tratamiento fue eficaz en todos los niños que lo finalizaron, siendo capaces de tolerar cualquier alimento. Sin embargo, no llevan a cabo unas pruebas de provocación para confirmar la pérdida de reactividad.

Solamente se han mostrado resultados satisfactorios en estudios de casos puntuales, en concreto en alergia al pescado (Freeman, 1930; Casimir y col., 1997). En uno de ellos, Casimir y col. (1997) reportan el caso de una niña de 39 meses con sibilancias, cianosis y urticaria severa tras el consumo y/o por inhalación de bacalao. Tras la desensibilización con inmunoterapia tipo "*rush*", la niña fue capaz de tolerar por inhalación e incluso ingerir pequeñas cantidades del pescado. En otro estudio, 12 pacientes que presentaban reacción de hipersensibilidad inmediata al cacahuete fueron seleccionados. De estos pacientes, 6 fueron tratados por un protocolo tipo *rush* que consistía en inyecciones de extracto de cacahuete (4 inyecciones/día) durante 5 días consecutivos, seguido de un protocolo *standard* con inyecciones semanales durante un año. En 4 pacientes se demostró el aumento de tolerancia a los cacahuets tras reprovocación, mientras que en 2 pacientes hubo que disminuir las dosis por la frecuencia de reacciones sistémicas (Nelson y col., 1997). A pesar del aumento en la tolerancia al consumo de cacahuets, estos protocolos no pueden considerarse seguros debido a la frecuencia de las reacciones adversas asociadas (Oppenheimer y col., 1992; Nelson y col., 1997).

En las alergias debidas a alimentos o a aeroalergenos se presentan síntomas clínicos y reacciones similares, sin embargo, los mecanismos de la alergia alimentaria son menos

evidentes. En la alergia por inhalación, las células Th2 inducen eosinofilia en vías respiratorias, hipersecreción mucosa e hiperrespuesta respiratoria, mientras que las Th1 causan respuesta inflamatoria debida fundamentalmente a neutrófilos (Cohn y col., 1998). Se ha sugerido el mecanismo Th1/Th2 en alergias a aeroalergenos pero no de forma tan evidente para alimentos (Blanco-Quirós y col., 1999).

En una revisión sobre inmunoterapia con alimentos, Nieto-García (2001) cita varias posibles razones para justificar la falta de eficacia de la inmunoterapia con alimentos frente a la de aeroalergenos. Entre las causas se encuentran las diferencias en el procesamiento entre alergenios inhalados y alimentarios, pudiendo la hidrólisis a la que son sometidos los alimentos aumentar la potencia alérgica de los mismos; diferencias en el procesamiento en el GALT y en el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT); las diferentes dosis de inhalantes (ng-microgramos) y de alimentos (fracciones de kilo) que penetran, etc.

#### **2.1.11.4.- NUEVOS AVANCES**

La aplicación de la inmunoterapia en el tratamiento de la alergia alimentaria ha obtenido resultados con elevada incidencia de efectos adversos. Por ello, su utilización con los protocolos habituales no es posible en la práctica clínica en el tratamiento de las alergias alimentarias (Nelson y col., 1997).

La mayor parte de las reacciones severas frente a alimentos suelen ser de tipo IgE, pero las reacciones no mediadas por IgE también pueden ser responsables de manifestaciones anafilácticas. La presencia de anticuerpos IgE como causantes de este tipo de reacciones plantea la posibilidad de cambiar esta reactividad alérgica a una forma menos nociva a través de la inmunoterapia o mediante modificación de la capacidad de los alergenios alimentarios de interaccionar con anticuerpos IgE gracias a técnicas de biología molecular (Burks y col., 2001).

Además, debido a la falta de una eficacia total de la inmunoterapia convencional en las alergias a alimentos, serían necesarias formas alternativas de inmunoterapia. De hecho, se están ya evaluando otras modalidades inmunoterapéuticas: 1) anticuerpos monoclonales

anti-IgE, 2) inmunoterapia con alérgenos modificados y con péptidos, 3) con plásmidos de DNA y 6) inmunoterapia con citoquinas (Sampson, 2001).

Los anticuerpos anti-IgE, están dirigidos frente al tercer dominio de la región Fc de las moléculas de IgE, no permitiendo su unión a FcRI ni a FcRII (Sampson, 2001). Se bloquea así, la unión del alérgeno a la IgE fijada a la membrana de mastocitos/basófilos (Nieto-García, 2001). Esta forma de tratamiento, va dirigida a múltiples sensibilizaciones, mientras que otros métodos inmunoterapéuticos están dirigidos a alérgenos específicos (Sampson, 2001). Así por ejemplo, estudios preliminares sugieren la utilización de fragmentos de alérgenos recombinantes, obteniendo fracciones de proteínas sin la capacidad de unirse a IgE (hipoalérgénicas) pero manteniendo su capacidad de inducir proliferación de células T (inmunogénicas) (Stanley y col., 1997; Burks y col., 1999). Por otra parte, y teniendo en cuenta que las reacciones mediadas por IgE son resultado de un exceso de citoquinas tipo Th2 por linfocitos T, CD4<sup>+</sup> y específicas del alérgeno, se está intentado dirigir esta respuesta hacia un patrón tipo Th1 (Sampson, 2001).

### **2.1.11.5.- FARMACOLÓGICO**

El tratamiento farmacológico es esencial en el tratamiento sintomático de las enfermedades alérgicas, especialmente en el asma. Ha sido eficaz en la supresión de síntomas y en mejorar la calidad de vida de estos pacientes, su función pulmonar y la hipereactividad bronquial. Por ello, se emplea de forma eficaz una vez que aparecen los síntomas (Warner, 2001). Sin embargo, para el tratamiento de las alergias alimentarias no se utilizan fármacos, aunque existen 2 excepciones. La primera, cuando se trata de una reacción con síntomas únicamente de tipo gastrointestinal tras la ingesta de un alimento: en este caso la reacción puede bloquearse con cromoglicato sódico vía oral. También en reacciones severas en las que se ponga en juego la vida del paciente, *shock* anafiláctico, se procede de manera inmediata a la inyección de adrenalina (Chandra, 1997). Existe poca evidencia sobre el valor de los antihistamínicos en reacciones a alimentos. En cualquier caso se trataría de antihistamínicos de acción rápida, sin efecto sedante, como la terfenadina (David y col., 1999).

Debido a la presencia de alérgenos enmascarados, y para evitar reacciones severas de forma inesperada, en el caso de niños alérgicos, tanto ellos como sus familiares y educadores, deberán de estar preparados no solamente a prevenir la exposición al alérgeno, ayudar a detectar la posible presencia de alérgenos, sino también a hacer frente a situaciones de emergencia en el caso de reacción inesperada (Sampson, 2000). Los pacientes altamente sensibles, con riesgo de padecer anafilaxis, deberán llevar un autoinyector subcutáneo de adrenalina para su uso en casos de urgencia y se les realizarán pruebas de reprovocación periódicas bajo supervisión médica (Yunginger, 1998).

Sería interesante conocer si algún tipo de farmacoterapia pudiera afectar al proceso que se ha denominado "marcha alérgica", actuando como prevención de este proceso (Warner, 2001).

## **2.1.12.- PREVENCIÓN**

El aumento notable de la prevalencia y morbilidad de las enfermedades alérgicas así como la limitación en el tratamiento de las alergias a alimentos, ha centrado el interés en la prevención de estas enfermedades. Debido al importante carácter genético de este tipo de patologías, la mayor parte de las medidas preventivas se han llevado a cabo en recién nacidos de alto riesgo. Para ello, resulta esencial la identificación de estos niños que presentan una mayor predisposición de desarrollar enfermedad alérgica y tomar las medidas preventivas lo antes posible (Lorente y Lozano, 1999; Chandra, 2002).

### **2.1.12.1.- IDENTIFICACIÓN DE NIÑOS DE ALTO RIESGO**

En el periodo neonatal la capacidad de generar una respuesta inmune celular y humoral es deficiente. Además, como ya se ha mencionado en apartados anteriores, durante los primeros meses de vida el intestino del lactante es más permeable a la absorción de macromoléculas debido a la mayor permeabilidad intestinal que presenta. Por ello, las medidas preventivas deberán dirigirse a los niños con mayor riesgo de desarrollar enfermedad atópica en edades tempranas. Para ello, es esencial predecir qué niños recién nacidos se encuentran en este grupo de alto riesgo.

Sería de gran interés contar con marcadores predictivos de enfermedad atópica, ya que su prevención sería entonces posible reduciendo la exposición a alérgenos en estos niños con mayor predisposición. En numerosos estudios se han analizado marcadores inmunológicos y no inmunológicos y han sido propuestos para el diagnóstico precoz de la atopía, pero ninguno por sí solo alcanza el grado de eficiencia necesario que permita su adopción general. Debido a la importancia de la carga genética de las enfermedades alérgicas, la historia familiar se ha considerado un medio de aproximación para intuir el riesgo de atopía en la práctica clínica, pero su baja eficiencia hace que sea preciso buscar otras pruebas más sensibles (Bergmann y Woodcock, 1998; Lorente y Lozano, 1999).

Se han determinado parámetros inmunológicos y no inmunológicos como posibles marcadores. Así, entre los parámetros inmunológicos destaca la determinación de los niveles elevados de IgE en sangre de cordón, IgE total y anticuerpos específicos en suero del lactante, porcentaje de eosinófilos y proteínas catiónicas de eosinófilos, subpoblaciones de linfocitos T inmunorreguladores, el cociente Th1/Th2, los receptores de IgE de baja afinidad y el factor soluble del receptor Fc RII. Y entre los no inmunológicos los niveles de fosfodiesterasa, y el número y función de las plaquetas (Wahn y Mutius, 2001).

Los marcadores más estudiados son los antecedentes familiares de atopía y los niveles de IgE total. A pesar de la especificidad relativamente alta (94%) de los niveles de IgE en sangre de cordón, su sensibilidad es bastante baja (26%). El valor predictivo no es muy alto, por lo que el uso de este parámetro como predictivo de enfermedad atópica ha sido muy cuestionado. De entre los factores predictivos en el desarrollo de alergia, parece ser que una historia familiar de atopía junto con niveles elevados de IgE en sangre de cordón son los mejores indicadores (Koning y col., 1996). Sin embargo, la capacidad predictiva de la historia clínica de los progenitores y los niveles de IgE en cordón no es suficientemente elevada como *test de screening* en prevención primaria, ya que la mayor parte de manifestaciones atópicas y sensibilizaciones tienen lugar en niños sin riesgo que pueda demostrarse en el nacimiento (Bergmann y Woodcock, 1998).

Otros estudios se han centrado en la evaluación de otros posibles marcadores predictivos de atopía. La capacidad de predicción de los factores anteriores (historia familiar e IgE en sangre de cordón) puede verse mejorada en combinación con otros

factores. Así, la evaluación de la reactividad alérgica por medio de la respuesta cutánea frente a alérgenos y la proliferación de linfocitos estimulados con alérgenos alimentarios (leche y huevo) aumenta la sensibilidad de los valores de IgE en sangre de cordón (Koning y col., 1996).

En otro estudio, se ha observado que los clones de células T específicas frente a *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*), procedentes de sangre de cordón de 9 niños de padres atópicos, presentan mayor producción de citoquinas Th2 que los recién nacidos sin historial familiar de atopía. Además, de los 5 niños en los que se pudo realizar un seguimiento hasta los 3 años, los 4 que desarrollaron síntomas atópicos mostraban el perfil tipo Th2 en el nacimiento. Los resultados sugieren que el patrón Th2 en linfocitos de cordón está relacionado no sólo con el estado atópico de los padres, sino también con el posterior desarrollo de atopía (Piccinni y col., 1996).

También se han analizado las concentraciones de IL-4 e IFN- $\gamma$  en sangre de cordón con un seguimiento hasta los 18 meses. Los niños que desarrollan enfermedad alérgica durante este tiempo presentan niveles más elevados de IL-4 en suero a los 3, 6, 9 y 18 meses. Sin embargo, no se ha observado relación con la producción de IFN- $\gamma$  (Borres y col., 1995).

En una revisión sobre la prevención de la alergia alimentaria, se resalta la importancia de considerar en el diseño de los estudios de evaluación, posibles factores de riesgo en el desarrollo de enfermedades alérgicas, así como el efecto de determinadas medidas preventivas. Deberán ser prospectivos tanto si son estudios de intervención como si no lo son, y con criterios diagnósticos bien definidos. El tamaño de muestra deberá ser suficiente para la evaluación estadística adecuada y el seguimiento de duración suficiente. Además, los estudios de intervención deberán ser randomizados, a doble ciego y con un control sobre los posibles factores de confusión. Por otra parte, también se considera importante que los estudios prospectivos de tipo no intervencional pueden generar hipótesis sobre causa y efecto en el desarrollo de enfermedades alérgicas; sin embargo, para confirmar de forma correcta la posible relación causa-efecto, se requiere demostrar el mecanismo causante y el efecto de la eliminación del factor sospechoso en la prevención (Host, 2001).

En la misma línea de investigación pero con el fin de evaluar posibles marcadores de persistencia de alergia, Jarvinen y col. (2002) estudian el reconocimiento por parte de anticuerpos IgE hacia epítomos de las proteínas de la leche, y tratan de evaluar si las diferencias en el reconocimiento del antígeno podrían servir para distinguir entre niños que van a desarrollar tolerancia o en los que la alergia va a persistir. Las determinaciones se llevaron a cabo en suero de 10 niños con alergia persistente y en otros 10 con alergia pero que subsecuentemente desarrollaron tolerancia. La presencia de anticuerpos IgE frente a distintos epítomos alergénicos de las proteínas de la leche podría ser útil como marcador predictivo de alergia persistente. Los autores concluyen sobre la necesidad de más estudios prospectivos sobre la utilidad de estos epítomos como indicadores de persistencia de alergia en niños pequeños (Jarvinen y col., 2002).

### **2.1.12.2.- MEDIDAS PREVENTIVAS**

Una vez que el niño de alto riesgo ha sido identificado, han de llevarse a cabo las medidas preventivas oportunas para prevenir la sensibilización alérgica IgE. Por ello, una primera medida irá encaminada a prevenir al niño de la exposición a alérgenos en las distintas fases. El niño se pondrá en contacto en primer lugar con alérgenos alimentarios a través de la placenta (Warner, 1999; Devereux y col., 2001), leche materna, fórmula infantil y seguidamente con la inclusión paulatina de los distintos alimentos sólidos. Las siguientes proteínas con las que se encontrará el sistema inmune serán vía inhalatoria: epitelios de animales, pólenes, ácaros del polvo, etc. (Anderson, 1997; Lorente y col., 2001).

Por tanto, las medidas de prevención pueden establecerse a dos niveles: En un primer nivel, tratando de evitar la sensibilización alérgica IgE. En segundo lugar, intentando evitar la aparición de enfermedad en aquellos pacientes ya sensibilizados. Y por último, previniendo la aparición de síntomas en pacientes que ya han manifestado la enfermedad (Lorente y col., 2001).

Si nos centramos en la prevención primaria, las medidas de prevención de alergias alimentarias serán similares a las que se realizan para prevenir otras enfermedades

alérgicas. Los protocolos de prevención de las enfermedades alérgicas, de manera equivocada o no, están dirigidos en su mayor parte de forma exclusiva a aquellos niños con alto riesgo de atopía. Por este motivo, es importante conocer los factores que intervienen en la expresión de las enfermedades alérgicas, y así, tras detectar de forma precoz los niños con mayor predisposición a padecer enfermedad alérgica, establecer en ellos las medidas preventivas oportunas (Lasley, 1999).

#### **2.1.12.2.1.- Exposición a alérgenos vía oral.**

##### **Leche materna**

Hay numerosas razones para explicar la menor probabilidad de desarrollar alergias por parte de los niños alimentados con la leche de la madre. La lactancia materna supone una reducción a la exposición y absorción de proteínas extrañas, favorece la maduración de la barrera intestinal, reduciendo el tiempo y grado de permeabilidad intestinal, presenta propiedades antiinfecciosas, etc. Numerosos estudios han comparado la alimentación materna con la inclusión temprana de fórmulas infantiles y su relación con la aparición de enfermedades. Existe controversia sobre el hecho de si la lactancia materna previene la alergia, pero la mayor parte de los estudios destacan su efecto protector (Baro y col., 2001).

La leche humana constituye el alimento ideal en los primeros meses de vida del niño. Además de aportar los nutrientes necesarios para el crecimiento de los recién nacidos, es fuente de compuestos con importantes actividades bioquímicas y fisiológicas importantes para el desarrollo de numerosos órganos y tejidos, factores de defensa contra Ags y agentes patógenos. Así, la leche humana contiene hormonas y factores de crecimiento, enzimas, proteínas y péptidos bioactivos, nucleótidos, poliaminas, etc. (Baró y col., 2001). Contiene una serie de elementos que aportan al niño inmunidad activa y pasiva. La Ig A secretora (Ig As) es la proteína predominante en el calostro y una de las principales en la leche madura. Se sintetiza en la glándula mamaria a partir de linfocitos de la madre. Estos linfocitos, tras exposición a Ags en las placas Peyer de la madre migran vía enteromamaria a las glándulas mamarias. Por esta razón, las IgAs son específicas frente a microorganismos y a alimentos presentes en el intestino de la madre. También los



linfocitos memoria del intestino migran por esta vía a la glándula mamaria (Hanson y col., 2001). Como consecuencia, la leche materna presenta anticuerpos frente a gran variedad de microorganismos, de hecho a todos a los que se exponen las placas Peyer durante la vida (Walterspiel y col., 1994). Esta IgAs protege de forma eficaz frente la traslocación de bacterias intestinales a través de la mucosa intestinal, por bloqueo de la interacción epitelial (Wold y Adlerberth, 2000). Además, estudios recientes indican que la protección frente a infecciones persiste durante años después de la lactancia. Este hecho podría ser debido a la estimulación del sistema inmune del niño por medio de anticuerpos antiidiotípicos, linfocitos y determinadas citoquinas que llegan al niño a través de la leche (Hanson y col., 2001).

Otros componentes como la lactoferrina que es la principal proteína en la leche materna, se le atribuye una variedad de propiedades. Entre ellas, la capacidad de inactivar bacterias, virus, células tumorales y de activar el sistema inmune, así como de bloquear la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF y IL-6) (Mattsby-Baltzer y col., 1996).

La fracción de oligosacáridos en la leche contiene diversas estructuras, que se comportan como receptores para microorganismos. De ahí, que pudieran prevenir la unión de éstos a la membrana mucosa, bloqueando las infecciones (Wold y Adlerberth, 2000). Sin embargo, el papel clínico de este mecanismo no ha sido todavía evaluado (Hanson y col., 2001).

Otro aspecto importante es el posible papel de las poliaminas de la leche materna como agentes preventivos de la alergia alimentaria. Una ingesta deficiente de poliaminas podría jugar un papel en la inducción de la sensibilización a alérgenos de la dieta. Los estudios en humanos indican que existe variabilidad individual en la concentración de poliaminas en la leche de distintas madres debido a factores genéticos, dietéticos, etc. En base a esto, la probabilidad de desarrollar alergia alimentaria puede llegar al 80% si la concentración media de espermina en leche es menor de 2nm/ml, y, 0% si es mayor de 13nmol/ml. Además, por otra parte, estudios preliminares muestran que la permeabilidad intestinal a macromoléculas varía en niños prematuros alimentados con leche materna o con fórmulas infantiles (Dandrifosse y col., 2000).

Distintos estudios han tratado de evaluar el efecto del control de la dieta de la madre durante la lactancia. Los resultados indican que la restricción de la dieta de la madre, potencia el efecto protector de la lactancia materna reduciendo la aparición de eczema al menos en los 2 primeros años de vida (Lorente y Lozano, 1999; Hattevig y col., 1999). En efecto, como resultado de distintos estudios se ha comprobado la presencia de Ags alimentarios en la leche materna. Así, se han observado Ags de leche de vaca, ovalbúmina y gliadina en leche materna, de 2 a 6 horas después de consumir la madre estos alimentos. En otro estudio, en 23 mujeres lactantes tras ingerir 50 g de cacahuètes, se fueron tomando muestras de leche en intervalos de una hora. En 11/23 se observa la presencia de proteínas del cacahuete. Los autores concluyen que la leche materna es una ruta de exposición que puede resultar en la sensibilización de niños de alto riesgo (Vadas y col., 2001). Sin embargo, hay que tener en cuenta que por ejemplo, 40 ml de leche humana contienen una cantidad de BLG de entre 32 ng/l y 1000 ng/l. En cambio, 40 ml de una fórmula de leche de vaca contienen 360.000 ng/l de BLG. Este contenido sería el equivalente a un aporte diario de 1 litro de leche humana durante un período de entre 7-21 años (Businco y col., 2001).

### **Fórmulas infantiles**

Como sustituto de la lactancia materna se pueden utilizar fórmulas infantiles adecuadas. Existen distintos tipos de fórmulas que son los hidrolizados de caseínas y de proteínas de suero, las fórmulas de soja y en el caso de que éstas no se toleren, las fórmulas elementales (Sicherer y col., 2001).

Aunque la utilización de fórmulas de soja ha sido objeto de discusión, finalmente según diversos estudios, parece que pueden presentar la misma alergenicidad que las fórmulas infantiles convencionales a base de leche de vaca, y por ello, no son aconsejables para prevenir la aparición de alergia alimentaria (Chandra y col., 1989; Businco y col., 1993; Burr y col., 1997).

En una exhaustiva revisión reciente se enfatiza la importancia de estimular la lactancia materna en todos los niños hasta los 4-6 meses de edad. Si ésta no es posible se

recomiendan las fórmulas hipoalérgicas altamente hidrolizadas para niños de alto riesgo. Con mayor frecuencia se observan reacciones adversas al utilizar fórmulas parcialmente hidrolizadas, por lo que su utilización como medida de prevención en niños con alto riesgo atópico no está aconsejada (Host, 2001).

### **Alimentos sólidos**

La introducción temprana de alimentos sólidos en la alimentación del niño, parece condicionar la aparición de enfermedades atópicas, por lo que se tiende a retrasar la introducción de determinados alimentos (Lorente y col., 2001). De hecho, no deberían ser introducidos hasta el 5º mes de vida. Sin embargo, no existe evidencia de dietas restrictivas como preventivas de alergia a partir de los 6 meses de edad (Host, 2001).

Los probióticos representan un suplemento nutricional con propiedades beneficiosas sobre la flora intestinal. Diversos estudios de laboratorio y de experimentación clínica, demuestran ciertos efectos de los probióticos para dificultar o impedir el desarrollo del mecanismo alérgico, prevenir o minimizar la aparición de alergopatías (Samartín y col., 2002). Aunque para algunos autores no parecen existir dudas sobre su eficacia, otros autores dudan de la eficacia real de los mismos. En este sentido, y considerando que uno de los principales efectos inmunomoduladores de las bacterias ácido lácticas, es sobre el aumento de la producción de IFN- $\gamma$  a nivel sistémico (Solís-Pereyra y Lemonnier, 1991; Marcos y col., 1996; Solís-Pereyra y col., 1997; Solís-Pereyra y col., 2002), este mecanismo podría servir para regular el desequilibrio Th2 característico de la respuesta alérgica (Cross y col., 2001). Algunos autores observan que los probióticos pueden disminuir la inflamación intestinal, y aliviar los síntomas en niños con eczema atópico (Matricardi y col., 1999; Isolauri y col., 2000), así como reducir la aparición de síntomas en niños de familias atópicas tras su consumo durante el embarazo y lactancia (Kalliomaki y col., 2001; Rautava y col., 2002).

#### **2.1.12.2.2.- Exposición ambiental.**

Se ha comprobado que la exposición al humo del tabaco y a determinados alérgenos ambientales juega un importante papel en el desarrollo de las enfermedades

alérgicas, por lo que las medidas de prevención deberán incidir también sobre estos factores (Lorente y col., 2001). Por ejemplo, la contaminación urbana se relaciona con una mayor incidencia de asma y otras enfermedades alérgicas. En concreto se ha demostrado que el fuel-oil favorece la sensibilización a sustancias inhaladas (Lorente y Lozano, 1999).

En un estudio llevado a cabo en 279 niños de alto riesgo para analizar el efecto de una serie de medidas preventivas dietéticas y ambientales (tabaco y alérgenos ambientales), se observa claramente una menor incidencia de manifestaciones alérgicas frente al grupo control al menos, hasta el tercer año de vida. Los autores indican que las medidas, tanto alimentarias como ambientales, son efectivas y aunque son difíciles de llevar a cabo, deberían aplicarse al menos en niños con alto riesgo de atopía (Marini y col., 1996). Kjellman y Nilson (1999) también recomiendan evitar la exposición al tabaco incluso durante el embarazo, el control de la humedad y la ausencia de animales domésticos en las casas.

Un mayor conocimiento sobre la identificación de las bases genéticas e inmunológicas de la atopía sería de gran interés en la prevención de la alergia a alimentos así como del resto de enfermedades atópicas. En este sentido, las manipulaciones genéticas (inducir tolerancia para diferentes alérgenos, modular los linfocitos T y las citoquinas) en niños de alto riesgo de atopía constituyen una aventura prometedora (Lorente y Lozano, 1999).

### **3.- SUJETOS Y MÉTODOS**

#### **3.1.- POBLACIÓN OBJETO DEL ESTUDIO**

El estudio se llevó a cabo en niños de 0 - 12 meses de edad que habían sufrido reacción adversa a la leche de vaca, y por tanto, con sospecha de alergia o intolerancia a la misma. En el estudio tomaron parte niños que acudieron a la consulta de Pediatría del Hospital 12 de Octubre de Madrid durante el periodo de meses 20 meses.

Los niños acudieron directamente al hospital tras sufrir reacción adversa a la leche de vaca, o dirigidos por su médico de familia para la realización de las pruebas diagnósticas de alergia/intolerancia alimentaria. El diagnóstico de alergia/intolerancia fue llevado a cabo por la Dra. García Hernández, Jefe de Sección, y el Dr. Martínez-Gimeno, Médico Adjunto, de la Sección de Neumología y Alergias Pediátricas del Departamento de Pediatría del Hospital 12 de Octubre de Madrid.

Todos los padres de los pacientes que participaron en el estudio dieron su consentimiento previo por escrito para la realización de las pruebas de provocación oral.

Estos pacientes, en función del diagnóstico hospitalario, fueron divididos en tres grupos:

1- Un primer grupo estaba constituido por pacientes con diagnóstico positivo de alergia a las proteínas de la leche de vaca.

2- Un segundo grupo estaba constituido por niños que fueron diagnosticados de presentar intolerancia a las proteínas de la leche de vaca.

3- El tercer grupo se consideró como grupo control y estaba formado niños en los que se descartó la existencia de alergia o intolerancia a las proteínas de la leche de vaca.

Con objeto de observar las diferencias entre las consecuencias debidas a la alergia y a la intolerancia a la leche de vaca se compararon los grupos 1 y 2. Los resultados de ambos grupos se compararon además con el grupo 3 para estudiar los efectos debidos a la alergia y a la intolerancia a la leche de vaca por separado, respectivamente.

### **3.2.- DISEÑO EXPERIMENTAL**

La homogenización de la muestra de estudio se llevó a cabo imponiendo unos criterios de inclusión en el estudio como se indica a continuación:

#### **3.2.1.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Niños con reacción adversa a la leche, citados por el servicio de Pediatría del Hospital 12 de Octubre, para consulta por sospecha de alergia o intolerancia a proteínas de la leche.
  
- Edad comprendida entre 0-12 meses.

Se trata de un estudio con diseño transversal, que constó de un punto de toma de muestra, y por tanto, un estudio descriptivo. La toma de muestras tuvo lugar, al diagnóstico de la enfermedad y en concreto, antes de las pruebas de provocación oral.

En el estudio se incluyeron 139 pacientes que por sospecha de alergia/intolerancia alimentaria, habían acudido a consulta en la sección correspondiente, del servicio de Pediatría del Hospital, durante un periodo de 20 meses.

### **3.3.- PARÁMETROS ESTUDIADOS**

En cada uno de los grupos objeto de estudio anteriormente citados se determinaron los siguientes parámetros:

### **3.3.1.- PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS**

- Edad
- Talla
- Peso
- Índice de masa corporal (índice de Quetelet) (IMC)

### **3.3.2.- PRUEBAS DE ALERGIA**

- Historial clínico
- Pruebas de provocación oral con el alérgeno sospechoso
- Pruebas cutáneas tipo *prick*
- Determinación de IgE total
- Determinación de IgE específica

### **3.3.3.- PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS**

-Serie eritrocitaria

Recuento de hematíes

Hemoglobina total

Índice hematocrito

Volumen corpuscular medio (VCM)

Hemoglobina corpuscular media (HCM)

Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)

-Serie trombocítica

Recuento de plaquetas

Volumen medio plaquetario (VMP)

Plaquetocrito (PTC)

Amplitud de distribución plaquetaria (PDW)

-Serie leucocitaria

Recuento de leucocitos

Fórmula leucocitaria

Recuento de:

Linfocitos

Monocitos

Neutrófilos

Eosinófilos

Basófilos

### **3.3.4.- PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS**

- Recuento y porcentaje de subpoblaciones linfocitarias:

CD2 (linfocitos T totales).

CD3 (linfocitos T maduros).

CD4 (linfocitos T colaboradores).

CD8 (linfocitos T citotóxicos-supresores).

CD56 (células NK).

CD19 (linfocitos B).

$\gamma\delta$ -TCR (Receptor  $\gamma\delta$  de linfocitos T).

- Cocientes linfocitarios CD4/CD8 y CD2/CD19

- Función inmune celular *in vitro* a través de la determinación de la secreción de citoquinas:

Th1: IL2, IFN- $\gamma$ ,

Th2: IL-4, IL-5, IL-10

Inflamatorias: IL1, TNF- $\alpha$  e IL6.

- Respuesta proliferativa de linfocitos a la estimulación con antígeno alimentario.



### **3.4.- DESARROLLO DE LOS ESTUDIOS**

Todos los niños objeto de los estudios citados en el diseño experimental se sometieron en ayunas a primera hora de la mañana, a la toma de los datos antropométricos y extracción de 6 ml de sangre venosa, a fin de realizar las determinaciones analíticas correspondientes.

#### **3.4.1.- OBTENCIÓN DE LA MUESTRA**

Los 6 ml de sangre se recogieron del siguiente modo:

1.- 2 ml en un tubo con EDTA-K<sub>3</sub>, con una concentración final de 8,5 g%.

- Se realizaron los recuentos globulares (eritrocitos, leucocitos y plaquetas), así como las determinaciones de hemoglobina, índice hematocrito, índices hemáticos (VCM, HCM y CHCM) y fórmula leucocitaria.
- Este tubo se utilizó también para la determinación de las subpoblaciones linfocitarias (500µl).

2.- 1,5 - 2 ml en tubos con heparina.

- Se realizaron los cultivos celulares para posterior determinación de citoquinas extracelulares estimuladas tras 48 horas de incubación.
- Se llevó a cabo el estudio de la respuesta proliferativa de linfocitos por estimulación con alérgeno alimentario tras 5 días de incubación.

3.- 2,5 - 3 ml se depositaron en un tubo seco con gel sin anticoagulante, que se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 minutos para obtener el suero y determinar a partir de éste, inmunoglobulinas séricas y secreción *in vivo* de citoquinas. Las alícuotas del suero se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis.

### **3.5.- TÉCNICAS ANALÍTICAS**

A continuación se explican detalladamente todas las técnicas analíticas empleadas en la determinación de los parámetros antropométricos, hematológicos e inmunológicos.

### **3.5.1.- PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS**

#### Talla, peso e índice de masa corporal

La talla se midió con un tallímetro marca ANO-SAYOL, de precisión 1mm.

El peso se determinó en una balanza electrónica marca SECA-ALPHA, modelo utilizado en pediatría.

El índice de masa corporal o de Quetelet viene expresado por la relación (W.H.O., 1986):

$$\text{Peso (kg)/Talla}^2 \text{ (m}^2\text{)}$$

Z score del Peso: o número de desviaciones estándar respecto a la media de la población.

### **3.5.2.- PRUEBAS DE ALERGIA**

#### -Historia clínica

Una historia cuidadosa es imprescindible en el diagnóstico de alergia e intolerancia a la leche.

#### **1.- Anamnesis**

En el interrogatorio detallado se tuvo en cuenta la siguiente información: momento de introducción de la leche de vaca, tipo de síntomas (cutáneos, gastrointestinales, respiratorios, etc.) y su relación con la toma, tiempo transcurrido entre la toma del alimento y el inicio de la reacción.

En relación con el inicio de los síntomas, las reacciones se han podido clasificar en:

- Inmediatas: entre minutos y hasta 4 horas, durante el período de prueba en el hospital.
- Retardadas: a partir de 4 horas. A veces estas reacciones se inician días después de la prueba, cuando el niño ya está en casa.

## **2.- Antecedentes personales**

Se interrogó sobre el tiempo de lactancia materna exclusiva así como sobre la administración de biberones durante el periodo perinatal (biberón pirata).

## **3.- Antecedentes familiares**

Se interrogó sobre la existencia de incidencia atópica de los padres y hermanos del niño con sospecha de procesos alérgicos. En caso positivo, detallando el tipo de alergia que éstos presentaban.

### -Pruebas de provocación oral con el alergeno sospechoso

Esta prueba se lleva a cabo tras la extracción de sangre.

Se aplica una pequeña cantidad de leche adaptada (la misma que para las pruebas tipo *prick*) sobre el labio, el area peribucal y la boca. Si el niño no presenta síntomas, se procede a la ingesta de cantidades crecientes de la leche adaptada (1, 3, 5, 10 ml, etc). A los 15 minutos de cada toma, se controla la posible aparición de síntomas. Si en cualquier momento se presenta algún síntoma, se suspende la prueba. En caso negativo, se continua la prueba hasta la ingesta de 90 ml. Si no hay reacción adversa, en su casa seguirá tomando la cantidad que normalmente ingiere durante una semana. Si durante este tiempo presentan algún síntoma contactan con el hospital para remitir los síntomas. De cualquier modo, transcurrida la semana se ponen en contacto con el servicio del hospital para informar sobre la tolerancia del producto.

-Pruebas cutáneas tipo *prick*

Se llevaron a cabo las pruebas cutáneas tipo *prick* con las proteínas de la leche (ALA, BLG, CAS), y *prick by prick* con la propia leche adaptada. La leche adaptada utilizada fue la que en ese momento estaba en circulación en el hospital: Damira (SANDOZ, del grupo Novartis).

El test tipo *prick* fue realizado en la parte del antebrazo con los alérgenos proporcionados por ALK (Allergologisk): leche de vaca al 1% P/V, ALA al 0,1% P/V, BLG al 0,1% P/V, CAS al 0,1% P/V, diluidos en suero fisiológico salino. Se utilizaron lancetas de 1mm (ALK). Como control positivo se usó histamina (10mg/ml) (ALK) y el diluyente (suero salino) se aplicó como control negativo. Transcurridos 15 minutos, se evaluó la reacción mediante lectura de los diámetros de induración producidos por cada antígeno.

Así, se clasificó como respuesta negativa cuando el paciente no presentó reacción o aun cuando existiera reacción y ésta fuera menor que la mitad de la reacción con la histamina.

Se consideró reacción positiva cuando la reacción fue como mínimo superior a la mitad que la reacción producida por la histamina.

Por otra parte, se considera respuesta positiva al test, la presencia de al menos una respuesta positiva frente a algunos de los extractos.

-Determinación de IgE total en suero

La concentración sérica de IgE total se determinó por nefelometría (Behring-100).

La técnica de inmunonefelometría permite una rápida medida cuantitativa de precipitación, en algunos casos facilitada con látex, para la determinación de

proteínas. Las proteínas presentes en la muestra reaccionan con antisueros altamente específicos para formar complejos antígeno-anticuerpo insolubles. La medida de la dispersión que sufre un rayo luminoso al atravesar esta suspensión es proporcional a la concentración de antígeno o proteína que nos interesa, en situación de anticuerpo en exceso. La aglutinación facilitada por látex se usa en reacciones de antígeno-anticuerpo que no permiten la formación de inmunocomplejos suficientemente grandes para ser medidos. En dicho caso el anticuerpo se encuentra absorbido a la superficie de partículas de látex, que en contacto con el antígeno proporcionan una aglutinación medible.

#### -Determinación de IgE específica en suero

Se determinaron los valores de IgE específica en suero por medio de la técnica UniCap (Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Suecia). El sistema CAP FEIA (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Suecia) proporciona una evaluación cuantitativa de los anticuerpos IgE específicos frente a alérgenos. Este sistema une al menos 3 veces la cantidad de alérgeno en la fase sólida, comparándolo con la técnica convencional de RAST.

Se trata de un test de inmunofluorescencia enzimática tipo “sandwich”. Los alérgenos correspondientes se encuentran unidos covalentemente al complejo inmunoCAP, y reaccionan con la IgE específica del suero del paciente. 40 µl de muestra se añaden a la matriz del inmunoCAP y se deja incubar durante 30 minutos a 37°C. Después de un primer lavado, la IgE no específica es eliminada. Se añaden 50 µl de enzima marcado con anticuerpos anti-IgE ( $\beta$ -galactosidasa-anti-IgE) y se incuba durante 150 minutos a 37°C, formándose un complejo anticuerpo-anti-IgE con el enzima-anti-IgE. Después de la incubación, el enzima-anti-IgE no unido es eliminado mediante otro lavado. Al complejo final se añaden 50µl de la solución de desarrollo incubando durante 10 minutos: se para la reacción

añadiendo la solución “stop” (600µl). Se mide después la fluorescencia del eluido y se compara directamente con la respuesta de los calibradores (curva estándar).

Los calibradores se analizan por duplicado para obtener una curva de calibración completa. La IgE está calibrada según “2nd International Reference Preparation 75/502 of human serum immunoglobulin E from WHO”.

El UniCAP 100 (12-3500-08) con su software incorporado, nos permite realizar todos los pasos del ensayo automáticamente, así como el cálculo de los resultados y la impresión de los mismos.

Sensibilidad: El límite de detección es  $< 0,35 \text{ kU}_A/\text{l}$ .

Rango de medida:

- para suero no diluido  $0,35\text{-}100 \text{ kU}_A/\text{l}$ .
- muestra diluida 1-100 es  $22\text{-}200 \text{ mg/l}$ .

A = anticuerpo específico frente al alergeno.

Valores  $\geq 0,35 \text{ kU}_A/\text{l}$  indican un incremento progresivo de la concentración relativa alergeno-anticuerpo específicos. Un resultado  $< 0,35 \text{ kU}_A/\text{l}$  representa ausencia o niveles indetectables de alergeno-anticuerpo específicos.

Medidas altas en la respuesta corresponden a valores altos de IgE específica en el suero de la muestra del paciente.

### **Evaluación de IgE específica: Clases.**

IgE específica Clases	Superior o igual a	Inferior a	Niveles de anticuerpos específicos IgE
6	Cal-100	-	Muy alto
5	Cal-50	Cal-100	Muy alto
4	Cal-17,7	Cal-50	Muy alto
3	Cal-3,5	Cal-17,5	Alto
2	Cal-0,7	Cal-3,5	Moderado
1	Cal-0,35	Cal-0,7	Bajo
0	-	Cal-0,35	Ausencia o no detectable

El diagnóstico positivo de alergia o intolerancia a la leche de vaca se estableció con base a la historia clínica y a los resultados de las pruebas de provocación oral. Además, dentro del grupo de niños que presentaron reacción tras las pruebas de provocación oral, se consideraron **alérgicos** aquellos en los que se demostró sensibilización del sistema inmune, mediante las pruebas cutáneas tipo *prick* y/o la determinación de IgE sérica específica frente a la leche de vaca y sus fracciones proteicas. El resto de los niños con provocación oral positiva pero con pruebas cutáneas tipo *prick* e IgE específica negativa, fueron diagnosticados de presentar **intolerancia** a la leche de vaca.

Una vez finalizadas las pruebas se enviaba un informe al paciente con un resumen de la historia clínica, los resultados, el diagnóstico y el tratamiento a seguir. Si las pruebas de provocación habían sido negativas, el niño era dado de alta en esa consulta indicándole que los controles posteriores serían llevados por su médico. En caso de tratarse de niños diagnosticados de alergia/intolerancia a las proteínas de leche de vaca se indicaba la fecha de la próxima consulta. En esta siguiente revisión después de dieta exenta de proteínas de la leche, se analizaba el estado general de niños, la introducción de nuevos alimentos en la dieta y su tolerancia, los posibles contactos de forma accidental con lácteos y los síntomas ocasionados, etc. Además, se llevaron a

cabo las pruebas de reprovocación con leche para confirmar la persistencia de alergia o el desarrollo de tolerancia.

#### -Determinación de IgG específica en suero

Se determinaron los valores de IgG sérica específica frente a la leche de vaca mediante la técnica de UniCap (Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Suecia). Es una prueba *in vitro* para la cuantificación de anticuerpos IgG específicos en el suero humano. Es un test de inmunofluorescencia enzimática, con igual fundamento que el llevado a cabo para la determinación de IgE específica en suero, explicado con detalle en el apartado anterior.

Brevemente, el antígeno de interés (leche de vaca) acoplado covalentemente al inmunoCAP reacciona con los anticuerpos IgG específicos presentes en la muestra diluida de suero del paciente. Tras un primer lavado la IgG no específica es eliminada, se añade un enzima marcado con anticuerpos anti-IgG formando un complejo. Después de la incubación el enzima-anti-IgG no unido es eliminado mediante otro lavado y el complejo final es incubado con la solución de desarrollo. Se para la reacción y se mide la fluorescencia del eluido. La evaluación de los resultados se compara directamente con la respuesta de los calibradores.

De igual forma que en la determinación de IgE específica, el UniCAP 100 permite realizar todos los pasos del ensayo automáticamente así como imprimir los resultados.

Sensibilidad: El límite de detección es 0,02 mg/l.

El rango de medida para una muestra de suero diluido: 1:100 es 2.0-200 mg/l.

### **3.5.3.- PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS**

#### -Serie eritrocitaria



El recuento de hematíes y las determinaciones de hemoglobina, hematocrito e índices hemáticos (VCM, HCM, CHCM) se realizaron en un contador automático H1 (Technicon-Bayer).

#### -Serie trombocítica

El recuento de plaquetas e índices plaquetarios (VMP, PDW, PTC) se realizaron en un contador automático H1 (Technicon-Bayer).

#### -Serie leucocitaria

El recuento de leucocitos totales, así como la fórmula leucocitaria se realizaron, simultáneamente con los parámetros de la serie roja, en un contador H1 (Technicon-Bayer). El recuento de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos se realizó a partir de estos parámetros.

### **3.5.4.- PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS**

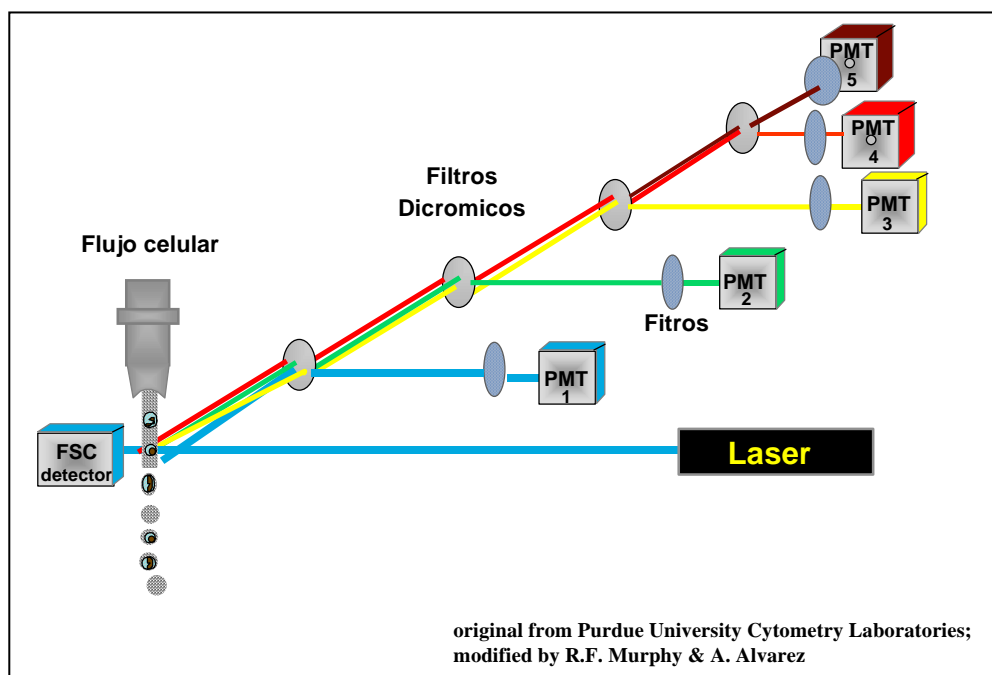
#### Recuento y porcentaje de subpoblaciones linfocitarias

Las subpoblaciones linfocitarias: células T totales (CD2), células T maduras (CD3), células T *helper* o cooperadoras (CD4), células T citotóxicas o supresoras (CD8), células B (CD19), células T con receptor  $\gamma\delta$  ( $\gamma\delta$ -TCR) y natural Killer (CD56)), se determinaron mediante la incubación de sangre venosa anticoagulada con EDTA-K<sub>3</sub>, con el anticuerpo monoclonal correspondiente a cada subpoblación, (CD4/CD8 (Leu-3a/2a), conjugado con un fluorocromo como el isocianato de fluoresceína (FITC) el CD4 y la ficoeritrina (PE) el CD8, CD3/CD19 (Leu-4/12) conjugado con FITC y PE respectivamente, CD2 (Leu-5b) conjugado con PE, CD56 (My31) conjugado PE,  $\gamma\delta$ -TCR (Anti-TCR- $\gamma\delta$ -1 conjugado con PE) (Becton-Dickinson, Mississauga, Ontario, Canadá), durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo de incubación, se añade solución lisante, en dilución 1/10 (en agua destilada), (FACS™ Lysing Solution, Becton Dickinson) 1 ml de solución por tubo de 100  $\mu$ l de sangre y se deja actuar durante 10 minutos. Después de 2 lavados con PBS (Phosphate buffer saline) se

deja en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$  y se procede a la lectura y análisis de la muestras en el citómetro de flujo.

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medida de emisión de fluorescencia y dispersión de luz, producidas por la iluminación apropiada de las células o partículas microscópicas de una en una y arrastradas por un flujo portador, a medida que desfilan frente a un sistema de detección (Figura 4).

**FIGURA 4-** ESQUEMA CITÓMETRO DE FLUJO.



El citómetro de flujo utilizado fue: FASCan (Becton-Dickinson). Este aparato consta de:

Sistema hidráulico: Rodea la suspensión celular en flujo, con una vaina externa, formada por un fluido libre de partículas, que mueve la muestra, a velocidad constante y controlada, a través de la zona de detección ("cámara de flujo"), donde las células o partículas son expuestas, una a una, al haz iluminador.

Sistema de iluminación: Produce un haz de luz que ilumina la muestra. La mayor parte de los citómetros (como es nuestro caso) utilizan luz láser, por ser

coherente, monocromática, polarizada, estrecha, estable y de intensidad conocida, aunque hay sistemas que disponen de lámparas de mercurio.

Sistema óptico: Enfoca la iluminación de las partículas de muestra, detecta la luz dispersada por ellas y selecciona la fluorescencia emitida, a medida que las partículas atraviesan el haz luminoso.

Sistema electrónico: Proporciona una iluminación de intensidad constante, detecta y amplifica la respuesta de las partículas en forma de pulso analógico, transforma las señales en forma digital y controla el proceso de separación celular electromagnética ("Cell Sorting").

Sistema de adquisición y análisis de datos: En la mayor parte de los citómetros modernos, es compatible con ordenadores personales y sistemas operativos comunes (plataformas Ms-DOS, Windows y MacIntosh). Permite la adquisición multiparamétrica de datos y el análisis en tiempo real y en modo de lista (matrices de datos no correlacionados), así como el análisis restringido a subpoblaciones seleccionadas ("acotamiento"). Los datos se presentan en forma de histogramas monoparamétricos o representaciones biparamétricas de la distribución, junto con información estadística de las distribuciones. Existen diferentes programas comerciales de apoyo, utilizables en ordenadores independientes (Alvarez-Barrientos y col., 2000).

Tras este análisis se calcularon los cocientes CD4/CD8 y CD2/CD19, como indicadores del estado nutricional (Marcos y col., 1997).

#### Función inmune celular:

##### a) Secreción de citoquinas medidas por ELISA.

La secreción de citoquinas se determinó en sobrenadantes procedentes de cultivos celulares tras 48 horas de incubación con un mitógeno.

Se parte de sangre heparinizada que se diluye con solución salina 1:1 y se procede a la separación de linfocitos en Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nyegaard, Oslo, Norway). El aislamiento de los linfocitos se realiza mediante centrifugación en gradiente de densidad en Lymphoprep (densidad:  $1.077 \pm 0.001$ g/ml). El proceso de separación se basa en la diferencia de densidad que existe entre los distintos tipos celulares. Las células mononucleares y las plaquetas se depositan en la parte superior del Lymphoprep, porque tienen menor densidad que éste. Los glóbulos rojos y los granulocitos tienen mayor densidad y se recogen en el fondo del tubo. Con un pipeta Pasteur se retira la banda de linfocitos. Se realizan dos lavados en medio RPMI-1640 (BioWhittaker, Verviers, Belgium) y se ajusta a una concentración de  $10^6$  células por cada 1ml de medio de cultivo. Este proceso de separación de linfocitos es común y previo a la siembra de cultivos para la determinación de citoquinas y de la proliferación de linfocitos.

Dichas células se resuspenden en el medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino (BioWhittaker) después de descomplementarlo y con una concentración al 1% de penicilina/estreptomicina (5000UI/ml:5000µg/ml, BioWhittaker). Una vez ajustado el número de células/ml se añade el mitógeno, PHA (Gibco BRL, Paisley, UK), antígeno alimentario (BLG, CAS) (Fluka, Sigma Aldrich), o se deja sin estimular. El mitógeno PHA activa a todas las células por igual es decir no tiene especificidad por un subtipo celular. Se añade a una concentración final  $7 \mu\text{g}/10^6$  células. Los antígenos alimentarios, BLG y CAS, se añaden a una concentración final de  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Se incuban a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera humidificada al 5% de  $\text{CO}_2$  durante 48 horas, período tras el cual se extraen los sobrenadantes y se almacenan a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su posterior procesamiento.

La determinación de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  se llevó a cabo por duplicado por medio de la técnica de ELISA usando los kits de Bender MedSystems, Vienna, Austria. El método de ELISA es un ensayo de inmunoadsorción acoplado a una actividad enzimática para la detección cuantitativa de citoquinas en sobrenadantes de cultivos celulares, suero humano, plasma, u otros fluidos. Se basa en la unión específica de la citoquina contenida en la muestra a anticuerpos monoclonales específicos inmovilizados sobre la superficie de placas de titulación. Para ello, las muestras y estándares apropiados se incuban en dichas placas con el anticuerpo, de forma que el antígeno a determinar (citoquina presente en la muestra) o el

estándar se une a los anticuerpos fijados al pocillo. Un segundo anticuerpo monoclonal anti-citoquina, conjugado con biotina, se añade también en esta incubación, el cual se une a la citoquina capturada por el primer anticuerpo. Tras la incubación, se elimina el segundo anticuerpo no unido mediante lavados repetidos en una solución buffer y se incubaba de nuevo en presencia de un conjugado Streptavidina-HRP que se unirá al conjugado de biotina. Con otra serie de lavados se elimina la Streptavidina-HRP no unida y se añade el sustrato de la enzima, obteniéndose un producto colorido de la reacción que es proporcional a la cantidad de citoquina presente en la muestra. La reacción se para con ácido fosfórico 1M y se mide la absorbancia a 450 nm.

De este análisis se obtienen medidas de absorbancia, que con posterioridad hay que transformarlo a concentraciones reales, se interpolan los resultados a una curva de calibración obtenida a partir de 7 concentraciones conocidas de la citoquina estudiada.

#### b) Secreción de citoquinas medidas por citometría de flujo

La determinación de IL2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10 se determinó también en sobrenadante de cultivos celulares tras 48 horas de incubación.

Se llevó a cabo por una técnica combinada de inmunoensayo y citometría de flujo (Human Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array, CBA) (Becton Dickinson). Esta técnica combina el fundamento del inmunoensayo con la citometría de flujo. 6 grupos de microesferas de poliestireno de igual tamaño (7,5 $\mu$ ) son teñidas con distintas intensidades de fluorescencia. Cada partícula ha sido unida mediante enlace covalente con un anticuerpo (Pharmingen, San Diego, CA) frente a una de 6 citoquinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10), representando una población concreta con una intensidad FL-3 de fluorescencia determinada. Este complejo Ac-partícula es capaz de unirse a la citoquina correspondiente y ser detectada de forma simultánea en la mezcla. La citoquina presente en la muestra, que se une al complejo, puede ser detectada por medio de inmunoensayo directo usando 6 anticuerpos diferentes unidos a PE (detector), (FL2). Tanto los estándares con concentraciones de 0-5000pg/ml como los reactivos (Ac-partícula, detector-PE) son mezclas de las 6 citoquinas.

La mezcla de 50µl de Ac-microesfera, 50µl de detector-PE, y 50µl de muestra o de estándares, se incuba durante 4 horas a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Después, se lava para eliminar el reactivo que no se ha unido y se procede a la lectura en el citómetro. Se obtienen 6 curvas estándares.

Diversos estudios muestran que su sensibilidad analítica es comparable a la de los test de ELISA convencionales (Chen y col., 1999).

c) Respuesta proliferativa de linfocitos estimulados

Los linfocitos se cultivan por triplicado en placas de 96 pocillos para microtritiación con fondo plano estériles en presencia o ausencia de mitógeno ( $7 \mu\text{g}/10^6$  células) o alérgeno BLG o CAS, a una concentración final de 100 µg/ml. Se cuentan las células de las suspensiones con una cámara Neubauer en microscopio. Se ajusta a  $10^6$  células/mL. Se ponen 200µl de suspensión en cada pocillo (200.000 células/pocillo).

Las placas se llevan al incubador, donde se incuban durante 5 días a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Al cabo de este tiempo, se sacan las placas, y en la campana de flujo se añade un pulso de 0,5µCi/50µl de CH<sub>3</sub>-<sup>3</sup>H-Timidina a cada pocillo, volviéndose a incubar las células durante 4 horas en la incubadora. Completado el tiempo de incubación, las células se recogen sobre filtros de fibra de vidrio (ICN), usando un cosechador semiautomático (Skatron Instruments). Los discos de filtro se secan y se introducen en viales de plástico (Kontron) a los que se añaden 4ml de líquido de centelleo Ecoscint H (ITISA). Se cuenta la <sup>3</sup>H timidina incorporada (en nuestro estudio se contó 1 minuto, pero la medida también depende de la eficiencia del contador) en un espectrofotómetro de radiación β. Se agitan los tubos fuertemente antes de ponerlos en el contador. Se recogen las cuentas por minuto (cpm) de cada tubo, y se hacen las medias de los triplicados. Se obtienen distintos valores.

- Proliferación basal. Son las cpm de los linfocitos cultivados en medio completo.
- Proliferación estimulada con PHA.
- Proliferación estimulada con CAS o BLG.

Los resultados también se puede expresar como índice de proliferación o *stimulation index* (SI), que corresponde al cociente entre el recuento de células con estimulación (mitógeno, alérgeno alimentario) y el recuento sin estimulación. Este índice relaciona la estimulación en presencia de mitógenos y la estimulación basal.

### **3.5.6.-TRATAMIENTO ESTADÍSTICO**

El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo en el centro técnico de informática del consejo superior de investigaciones científicas (CSIC), mediante el programa estadístico SPSS versión 11.0.

#### 1) Análisis descriptivo univariante:

Se realizó el cálculo de los estadísticos básicos (medias y varianzas) y se realizaron pruebas de ajuste de las distribuciones de las distintas variables de la muestra.

Para algunos casos en los que no se puede asegurar una distribución normal, se diseñaron nuevas variables realizando una transformación del tipo raíz cuadrada a dichas variables. Sin embargo, en las tablas se muestran siempre los valores de estas variables, sin transformar.

#### 2) Modelos lineales generales:

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía (grupo) con tres niveles: control, alérgicos e intolerantes.

Se determinó el grado de significación estadística de la diferencia entre las medias mediante el test de pares a posteriori de Bonferroni para contrastar las diferencias entre los grupos dos a dos.

En los casos en que la distribución normal no pudo ser asegurada se aplicaron pruebas estadísticas no paramétricas como el test de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis para establecer el grado de significación entre grupos dos a dos en el primer caso y los tres de manera simultánea en el segundo.

Además, para reforzar estos contrastes se ha hecho estadística de comparación entre alérgicos e intolerantes evitando el grupo control. Por otra parte, se ha considerado el grupo de pacientes, es decir, niños alérgicos y niños intolerantes como un solo grupo, y se han comparado los resultados con el grupo control. En ambos casos se ha utilizado el test de Mann-Whitney para pruebas no paramétricas.

En algunas pruebas (*prick* cutáneo, determinación de IgE específica, proliferación de linfocitos, producción de citoquinas *in vitro*), se comparó para cada grupo de niños de estudio, la respuesta relacionada con la utilización de los distintos alérgenos. Para ello, se utilizaron entre las pruebas para resultados no paramétricos, el test de Friedman para comparación de las variables entre sí, y el test de pares de Wilcoxon para comparar variables dos a dos.

Por otro lado, algunas variables, se analizaron dentro de cada grupo de niños por intervalos de edades. Así, se dividió cada grupo de niños en 3 intervalos de edad: 1) de 0 a 4 meses, 2) de 5 a 8 meses y, 3) de 9 a 12 meses; y se compararon los resultados de las variables para cada grupo de niños y en función de estos intervalos de edades.

Para los datos en escala nominal se han realizado tablas de contingencia para 2 factores: el grupo de niños (controles, alérgicos, intolerantes) y la variable correspondiente en cada caso. Se ha estudiado la dependencia entre ambos factores mediante la prueba de Chi-cuadrado de Pearson. En todo caso se ha aceptado un nivel de significación estadística de  $p < 0,05$ .



3) Correlaciones:

Se realizó una selección de las variables que se consideraron de mayor interés estudiándose la matriz de correlación entre las distintas pruebas inmunológicas en el diagnóstico de la alergia/intolerancia a las proteínas de la leche. Se estudió la dependencia lineal por medio del coeficiente  $\rho$  de correlación y su significación estadística.

**TABLA 1.** DISTRIBUCIÓN DE SEXO EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES.

Sexo	Control (n=44)		Alergia (n=79)		Intolerancia (n=16)		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Niños	17	38,6	43	54,4	6	37,5	66	47,5
Niñas	27	61,4	36	45,6	10	62,5	73	52,5
<i>Total</i>	44	31,7	79	56,8	16	11,5	139	100

N= número de sujetos

**TABLA 2.** EVOLUCIÓN DE LOS PACIENTES ALÉRGICOS E INTOLERANTES HACIA ALERGIA, INTOLERANCIA O DESARROLLO DE TOLERANCIA.

Evolución*	Alergia (n=53)		Intolerancia (n=11)		Total (n=64)	
	N	%	N	%	N	%
Alergia	46	86,8	5	45,5	51	79,7
Intolerancia	0	0	1	1,6	1	1,6
Tolerancia	7	13,2	5	45,5	12	18,8

N = número de sujetos

\*Dependencia entre factores: grupo de pacientes y su evolución ( $\chi^2$  de Pearson;  $p<0,05$ ).**TABLA 3.** PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS DE CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES.

	Control (n=44)	Alergia (n=79)	Intolerancia (n=16)
Edad (meses)	6,27±3,11	6,77±2,76	5,91±4,67
Peso (kg)*	7,24±1,65 <sup>ac</sup>	7,68±1,50 <sup>ab</sup>	6,45±1,75 <sup>c</sup>
Peso-P50	-0,56±0,97	-0,44±1,26	-0,97±0,98
Z score Peso	-0,60±1,19	-0,45±1,40	-1,11±1,20
Talla (m)	0,658±0,06	0,672±0,05	0,649±0,06
IMC (kg/m <sup>2</sup> )*	16,49±1,79 <sup>a</sup>	16,81±1,50 <sup>b</sup>	15,59±1,43 <sup>a</sup>

Valores expresados como media ± desviación estándar

\*Diferencias significativas entre grupos (ANOVA;  $p<0,05$ ).<sup>ab</sup>Diferencias significativas entre pares de grupos (test pares de Bonferroni;  $p<0,05$ ).

**TABLA 4.** PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS DE CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS E INTOLERANTES).

	<b>Control</b> (n=44)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=95)
Edad (meses)	6,27±3,11	6,62±3,15
Peso (kg)	7,24±1,65	7,47±1,60
Peso-P50	-0,56±0,96	-0,53±1,22
Z score Peso	-0,60±1,19	-0,56±1,38
Talla (m)	0,658±0,06	0,667±0,05
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	16,49±1,79	16,62±1,61

Valores expresados como media ± desviación estándar

**TABLA 5.** DISTRIBUCIÓN POR EDADES DEL TOTAL DE NIÑOS ESTUDIADOS.

<b>Edad</b> (meses)	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>
0-4	37	26,6
5-8	73	52,5
9-14	29	20,9
<i>Total</i>	139	100

**TABLA 6.** DISTRIBUCIÓN POR EDADES DENTRO DE CADA GRUPO DE NIÑOS ESTUDIADOS: CONTROLES, ALÉRGICOS, INTOLERANTES.

Edad (meses)	<b>Control</b> (n=44)		<b>Alergia</b> (n=79)		<b>Intolerancia</b> (n=16)	
	N	%	N	%	N	%
0 - 4	12	27,3	19	24,1	6	37,5
5 - 8	24	54,5	41	51,9	8	50
9 - 12	8	18,2	19	24,1	2	12,5
<i>Total</i>	44	100	79	100	16	100

N= número de sujetos

**TABLA 7.** CARACTERÍSTICAS DE LA LACTANCIA MATERNA EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES.

	<b>Control</b> (n=44)		<b>Alergia</b> (n=78)		<b>Intolerancia</b> (n=16)	
Lactancia Exclusiva	3,50±1,88		3,90±1,91		3,12±1,55	
	N	%	N	%	N	%
≤ 4 meses	29	65,9	43	55,1	13	81,2
> 4 meses	15	34,1	35	44,9	3	18,8
Biberón pirata	27	61,4	55	70,5	7	43,8

N= número de sujetos

**TABLA 8.** CARACTERÍSTICAS DE LA LACTANCIA MATERNA EN CONTROLES, Y PACIENTES (ALÉRGICOS E INTOLERANTES).

	<b>Control</b> (n=44)		<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=94)	
Lactancia exclusiva (m)	3,52±1,89		3,77±1,89	
% de sujetos	N	%	N	%
≤ 4 meses	29	65,9	56	59,6
> 4 meses	15	34,1	38	40,4
Biberón pirata	27	61,4	62	66

N= número de sujetos

**TABLA 9.** TIEMPO Y TIPO DE REACCIÓN ANTE LA INTRODUCCIÓN DE FÓRMULA INFANTIL EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES, EXPRESADO EN % DE SUJETOS.

	<b>Control</b> (n=44)	<b>Alergia</b> (n=78)	<b>Intolerancia</b> (n=16)	<b>Total</b> (n=138)
<b>Tiempo</b>				
- Inmediato	65,9	66,7	75	67,4
- Retardado	34,1	33,3	25	32,6
<b>Tipo</b>				
- Cutánea	70,5	67,5	56,3	67,2
- Digestiva	11,4	15,6	25,0	15,3
- Ambas	15,9	16,9	18,8	16,8
- Respiratoria	2,3	0	0	0,7

**TABLA 10.** DISTRIBUCIÓN DE LOS ANTECEDENTES FAMILIARES DE PRIMER GRADO DE ENFERMEDAD ATÓPICA EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES, EXPRESADO EN % DE SUJETOS.

	<b>Control</b> (n=40)	<b>Alergia</b> (n=77)	<b>Intolerancia</b> (n=15)	<b>Total</b> (n=132)
<u>Madre</u>	22,5	27,3	33,3	26,5
Alergia a alimentos	11,1	15,1	0	11,8
Otros	88,9	85	100	88,2
<u>Padre</u>	17,5	32	13,3	25,4
Alergia a alimentos	0	8,3	50	9,1
Otros	100	91,7	50	90,9
<u>Hermanos</u>	14,3	38,7	30	30,9
Total hermanos	9	20	7	36

**TABLA 11.** DISTRIBUCIÓN DE LOS ANTECEDENTES FAMILIARES DE PRIMER GRADO DE ENFERMEDAD ATÓPICA EN CONTROLES, Y PACIENTES (ALÉRGICOS E INTOLERANTES), EXPRESADO EN % DE SUJETOS.

	<b>Control</b> (n=40)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=15)
<u>Madre</u>	22,5	28,3
Alergia a alimentos	11,1	12
A otros	88,9	88
<u>Padre</u>	17,5	28,9
Alergia a alimentos	0	11,5
A otros	100	88,5
<u>Hermanos</u>	14,3	36,6
Total de hermanos	9	27

**TABLA 12.** DISTRIBUCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA PRUEBA DE PROVOCACIÓN ORAL EN NIÑOS CON ALERGIA O INTOLERANCIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE, EXPRESADO EN % Y ENTRE PARÉNTESIS, EN NÚMERO DE PACIENTES.

	<b>Alergia</b> (n=77)	<b>Intolerancia</b> (n=12)	<b>Total</b> (n=89)
<b>Tiempo de reacción*</b>			
Inmediata	87,3 (69)	41,7 (5)	81,3 (74)
Retardada	12,7 (10)	58,3 (7)	18,7 (17)
<b>Tipo de reacción*</b>			
<u>Cutánea</u>	92,2 (71)	58,3 (7)	87,6 (78)
- Local	88,9 (64)	71,4 (5)	87,3 (69)
- Generalizada	11,1 (8)	28,6 (2)	12,7 (10)
<u>Digestiva</u>	1,3 (1)	41,7 (5)	6,7 (6)
<u>Ambas</u>	6,5 (5)	0	5,6 (5)

\*Dependencia entre ambos factores: alergia, intolerancia con tiempo de reacción y alergia, intolerancia con tipo de reacción ( $\chi^2$  de Pearson;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 13.** RESPUESTA AL TEST CUTÁNEO TIPO *PRICK* FRENTE A LECHE DE VACA,  $\alpha$ -LACTOALBÚMINA (ALA),  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) Y CASEÍNA, EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES.

	Control <sup>#</sup> (n=44)	Alergia <sup>#</sup> (n=79)	Intolerancia <sup>#</sup> (n=16)
<i>Prick</i> Leche*	0,25±0,65 <sup>1a</sup>	2,14±1,10 <sup>1b</sup>	0,19±0,40 <sup>12a</sup>
<i>Prick</i> ALA*	0,11± 0,49 <sup>2a</sup>	1,90± 1,47 <sup>12b</sup>	0,38± 0,50 <sup>1a</sup>
<i>Prick</i> BLG*	0,18± 0,50 <sup>12a</sup>	1,54± 1,25 <sup>2b</sup>	0,19± 0,40 <sup>12a</sup>
<i>Prick</i> Caseína*	0,09±0,36 <sup>2a</sup>	1,24± 1,18 <sup>3b</sup>	0,06±0,25 <sup>2a</sup>
<i>Prick by Prick</i> *	0,11±0,32 <sup>a</sup>	0,89±0,31 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>

Valores expresados como media ± desviación estándar

\*Diferencias significativas entre controles, alérgicos e intolerantes (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ).

<sup>ab</sup>Diferencias significativas entre pares de grupos (test pares de Tamhane;  $p < 0,05$ ).

Dentro de cada grupo de niños de estudio:

<sup>#</sup>Diferencias significativas entre los distintos alérgenos ( $\chi^2$  de Friedman;  $p < 0,05$ ).

<sup>12</sup>Diferencias significativas entre pares de alérgenos (test pares de Wilcoxon;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 14.** SENSIBILIZACIÓN A LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE DE VACA, COMO RESPUESTA POSITIVA AL TEST *PRICK* CUTÁNEO, EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES.

	Control (n=44)		Alergia (n=78)		Intolerancia (n=16)	
	N	%	N	%	N	%
<i>Prick</i> Leche <sup>#</sup>	3	6,8	61	78,2	0	0
<i>Prick</i> ALA <sup>#</sup>	1	2,3	50	63,3	0	0
<i>Prick</i> BLG <sup>#</sup>	2	4,5	43	54,4	0	0
<i>Prick</i> Caseína <sup>#</sup>	1	2,3	33	42,3	0	0
<i>Prick by prick</i> <sup>#</sup>	5	11,4	65	89	0	0

N= número de respuestas positivas

<sup>#</sup>Dependencia entre los factores: grupo de niños y respuesta positiva a cada uno de los alérgenos del test ( $\chi^2$  de Pearson;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 15.** RESPUESTA POSITIVA AL PRICK TEST FRENTE A  $\alpha$ -LACTOALBÚMINA POR GRUPOS DE EDAD EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES.

Edad (meses)	Control (n=44)		Alergia <sup>#</sup> (n=79)		Intolerancia (n=16)	
	N	%	N	%	N	%
0 - 4	0	0	7	36,8	0	0
5 - 8	1	4,2	26	63,4	0	0
9 - 12	0	0	17	89,5	0	0

N= número de sujetos

<sup>#</sup>Dependencias significativas entre factores: grupo de niños y respuesta positiva al test por intervalos de edad ( $\chi^2$  de Pearson;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 16.** IG E SÉRICA TOTAL EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES.

IgE total* (UI/l)	Control (n=41)	Alergia (n=70)	Intolerancia (n=14)
Media $\pm$ desviación estándar	16,03 $\pm$ 30,99 <sup>a</sup>	44,29 $\pm$ 51,67 <sup>b</sup>	18,37 $\pm$ 32,24 <sup>ab</sup>
Mediana	5,50	28,0	6,34
Rango intercuartil	4,38-13,90	14,0-51,25	4,38-10,70

\*Diferencias entre controles, alérgicos e intolerantes (ANOVA;  $p < 0,05$ ).

<sup>ab</sup>Diferencias significativas entre pares de grupos (test pares Bonferroni;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 17.** IG E SÉRICA TOTAL, EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS E INTOLERANTES).

IgE total* (UI/l)	Controles (n=41)	Alergia + Intolerancia (n=84)
Media $\pm$ desviación estándar	16,03 $\pm$ 30,99	39,97 $\pm$ 49,76
Mediana	5,50	22,20
Rango intercuartil	4,38-13,90	10,62-43,00

\*Diferencias significativas entre controles y pacientes (Test-t;  $p < 0,05$ )



**TABLA 18.** CONCENTRACIONES NORMALES DE IG E SÉRICA TOTAL DE ACUERDO CON VALORES DE REFERENCIA DEL LABORATORIO DE ANÁLISIS.

Edad	IgE UI/ml
< 1 año	< 30
1-2 años	< 50
2-3 años	< 45
3-9 años	< 103
Adultos	< 250

**TABLA 19.** PORCENTAJE DE NIÑOS DE CADA GRUPO, CON VALORES DE IG E SÉRICA TOTAL SUPERIORES A LOS VALORES DE REFERENCIA.

Edad (meses)	Control				Alergia <sup>#</sup>				Intolerancia			
	<30UI/ml		≥30UI/ml		<30UI/ml		≥30UI/ml		<30UI/ml		≥30UI/ml	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
0 - 4	12	100	0	0	13	76,5	4	23,5	5	100	0	0
5 - 8	18	85,7	3	14,3	18	50	18	50	5	71,4	2	28,2
9 - 12	6	85,7	1	14,3	6	35,3	11	64,7	2	100	0	0
<i>Total</i>	36	90	4	10	37	52,9	33	47,1	12	85,7	2	14,3

<sup>#</sup>Dependencias entre factores: intervalos de edad y grupos de niños ( $\chi^2$  de Pearson;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 20.** IG E ESPECÍFICA FRENTE A LECHE DE VACA,  $\alpha$ -LACTOALBÚMINA (ALA),  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) Y CASEÍNA (CAP, EN KU/L).

	<b>Control<sup>#</sup></b> (n=41)	<b>Alergia<sup>#</sup></b> (n=70)	<b>Intolerancia</b> (n=14)
CAP Leche*	0,69±0,86 <sup>12a</sup>	7,47±9,94 <sup>1b</sup>	0,36±0,0 <sup>a</sup>
CAP ALA*	0,66±1,27 <sup>12a</sup>	4,14±7,36 <sup>2b</sup>	0,35±0,00 <sup>a</sup>
CAP BLG*	0,51±0,96 <sup>1a</sup>	2,79±5,43 <sup>2b</sup>	0,35±0,00 <sup>a</sup>
CAP Caseína*	0,62±1,06 <sup>2a</sup>	7,00±10,61 <sup>1b</sup>	0,36±0,05 <sup>a</sup>

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

\*Diferencias significativas entre grupos (ANOVA;  $p < 0,05$ ).

<sup>a,b</sup>Diferencias significativas entre pares de grupos (test pares de Bonferroni;  $p < 0,05$ ).

Dentro de cada grupo de niños de estudio:

<sup>#</sup>Diferencias significativas en respuesta a alérgenos ( $\chi^2$  de Friedman;  $p < 0,05$ ).

<sup>1,2</sup>Diferencias significativas entre pares de alérgenos (test pares de Wilcoxon;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 21.** IG E ESPECÍFICA FRENTE A LECHE DE VACA,  $\alpha$ -LACTOALBÚMINA (ALA),  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) Y CASEÍNA (CAP CLASE), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES.

	<b>Control</b> (n=41)	<b>Alergia</b> (n=70)	<b>Intolerancia</b> (n=14)
CAP Leche*	0,39±0,80 <sup>a</sup>	2,34±1,08 <sup>b</sup>	0,07±0,27 <sup>a</sup>
CAP ALA*	0,29±0,78 <sup>a</sup>	1,41±1,36 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>
CAP BLG*	0,15±0,53 <sup>a</sup>	1,31±1,19 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>
CAP Caseína*	0,29±0,75 <sup>a</sup>	2,13±1,05 <sup>b</sup>	0,07±0,27 <sup>a</sup>

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

\*Diferencias significativas entre controles, alérgicos e intolerantes (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ).

<sup>ab</sup>Diferencias significativas entre pares de grupos (test pares de Tamhane;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 22.** IG E ESPECÍFICA FRENTE A LECHE DE VACA,  $\alpha$ -LACTOALBÚMINA (ALA),  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) Y CASEÍNA EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES.

	Control (n=41)		Alergia (n=70)		Intolerancia (n=14)	
	N	%	N	%	N	%
CAP Leche <sup>#</sup>	6	14,6	59	84,3	0	0
CAP ALA <sup>#</sup>	4	9,8	33	47,1	0	0
CAP BLG <sup>#</sup>	1	2,4	35	50,0	0	0
CAP Caseína <sup>#</sup>	5	12,2	54	77,1	0	0

N= número de respuestas positivas

<sup>#</sup>Dependencia entre los factores: grupo de niños y respuesta positiva a cada uno de los alérgenos ( $\chi^2$  de Pearson;  $p<0,05$ ).

**TABLA 23.** PRESENCIA DE IG E ESPECÍFICA (CAP) FRENTE A LECHE DE VACA POR GRUPOS DE EDAD.

Edad (meses)	Control (n=41)		Alergia <sup>#</sup> (n=70)		Intolerancia (n=14)	
	N	%	N	%	N	%
0 – 4	1	9,1	11	73,7	0	100
5 – 8	5	22,7	30	81,1	0	100
9 – 12	0	0	18	100	0	100

<sup>#</sup>Dependencia entre factores: edad y grupo de niños ( $\chi^2$  de Pearson;  $p<0,05$ ).

**TABLA 24.** IG G FRENTE A LA LECHE, EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES (mgA/L).

IgG (mgA/L)	Control (n=38)	Alergia (n=60)	Intolerancia (n=14)
Media $\pm$ SD	100,71 $\pm$ 15,71	108,11 $\pm$ 26,09	112,03 $\pm$ 30,09
Mediana	101,0	99,70	99,05
RIQ	89-110,2	92,9-115,2	89,8-139,2

RIQ = Rango intercuartil

**TABLA 25.** IG G SÉRICA FRENTE A LA LECHE, EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS E INTOLERANTES) (mgA/L).

IgG (mgA/L)	Control (n=38)	Alergia + Intolerancia (n=74)
Media ± DS	100,71±15,71	108,85±26,71*
Mediana	101,0	99,60
RIQ	89-110,2	92,5-117,2

RIQ = Rango intercuartil

\*Diferencias significativas entre controles y pacientes (Test-t;  $p<0,05$ )**TABLA 26.** IGG SÉRICA FRENTE A LA LECHE EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES POR INTERVALOS DE EDAD (mgA/L).

Edad (meses)	Control* (n=38)	Alergia (n=60)	Intolerancia (n=14)
0 – 4	107,80±16,02 <sup>a</sup>	108,41±20,17	102,30±22,46
5 – 8	100,92±14,94 <sup>a,b</sup>	112,12±29,87	120,43±36,65
9 – 12	89,60±11,44 <sup>b</sup>	100,34±22,43	106,95±28,35

Valores expresados como media ± desviación estándar

Dentro de cada grupo de niños de estudio:

\*Diferencias significativas para los diferentes intervalos de edad (Welch y Brown-Forsythe;  $p<0,05$ ).<sup>a,b</sup>Diferencias significativas entre grupos de edad (test pares de Tamhane;  $p<0,05$ ).

**TABLA 27. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS (SERIE ERITROCITARIA) EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES.**

	<b>Control</b> (n=43)	<b>Alergia</b> (n=78)	<b>Intolerancia</b> (n=15)
Hematíes ( $\times 10^{12}/l$ )	4,18 $\pm$ 0,39	4,30 $\pm$ 0,33	4,11 $\pm$ 0,58
Hemoglobina (g/dl)	11,37 $\pm$ 0,85	11,39 $\pm$ 0,83	11,34 $\pm$ 1,28
Hematocrito (%)	33,47 $\pm$ 2,44	33,58 $\pm$ 2,53	33,09 $\pm$ 4,19
VCM* (fl)	80,33 $\pm$ 6,25	78,22 $\pm$ 4,75	80,91 $\pm$ 5,94
HCM* (pg)	27,34 $\pm$ 2,60	26,54 $\pm$ 1,62	27,77 $\pm$ 2,38
CHCM (g/dl)	33,99 $\pm$ 0,94	33,96 $\pm$ 0,93	34,32 $\pm$ 1,05
IDH (%)	14,86 $\pm$ 1,25	15,15 $\pm$ 1,61	14,47 $\pm$ 1,89

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

\*Diferencias significativas entre controles, alérgicos e intolerantes (ANOVA;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 28. VALORES DE REFERENCIA.**

	<b>3 meses</b>	<b>1 año</b>
Hematíes ( $\times 10^{12}/l$ )	4,0 $\pm$ 0,8	4,4 $\pm$ 0,8
Hemoglobina (g/dl)	11,5 $\pm$ 2,0	12,0 $\pm$ 1,5
Hematocrito (%)	38 $\pm$ 6	40 $\pm$ 4
VCM (fl)	95 (media)	78 $\pm$ 8
HCM (pg)	29 $\pm$ 5	27 $\pm$ 4
CHCM (g/dl)	32,5 $\pm$ 2,5	32,5 $\pm$ 2,5

**TABLA 29.** PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS (SERIE ERITROCITARIA) EN CONTROLES Y PACIENTES.

	<b>Control</b> (n=43)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=93)
Hematíes ( $\times 10^{12}/l$ )	4,18 $\pm$ 0,39	4,27 $\pm$ 0,39
Hemoglobina (g/dl)	11,37 $\pm$ 0,85	11,35 $\pm$ 0,92
Hematocrito (%)	33,47 $\pm$ 2,44	33,47 $\pm$ 2,82
VCM (fl)	80,33 $\pm$ 6,25	78,58 $\pm$ 5,00
HCM (pg)	27,34 $\pm$ 2,60	26,69 $\pm$ 1,84
CHCM (g/dl)	33,99 $\pm$ 0,94	33,97 $\pm$ 1,00
IDH (%)	14,86 $\pm$ 1,25	15,02 $\pm$ 1,67

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

**TABLA 30.** PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS (SERIE TROMBOCÍTICA) EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES.

	<b>Control</b> (n=43)	<b>Alergia</b> (n=78)	<b>Intolerancia</b> (n=15)
Plaquetas ( $\times 10^9/l$ )	400,71 $\pm$ 76,65	405,71 $\pm$ 106,87	382,35 $\pm$ 142,42
VPM (fl)	8,57 $\pm$ 0,72	8,47 $\pm$ 1,17	8,34 $\pm$ 1,44
PDW (%)	24,37 $\pm$ 13,62	26,91 $\pm$ 15,47	33,53 $\pm$ 18,25
PTC (%)	0,34 $\pm$ 0,07	0,34 $\pm$ 0,08	0,31 $\pm$ 0,12

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

**TABLA 31.** PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS (SERIE TROMBOCÍTICA) EN CONTROLES Y PACIENTES.

	<b>Control</b> (n=43)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=93)
Plaquetas ( $\times 10^9/l$ )	400,71 $\pm$ 76,65	405,69 $\pm$ 115,30
VPM (fl)	8,57 $\pm$ 0,72	8,45 $\pm$ 1,20
PDW (%)	24,37 $\pm$ 13,62	27,98 $\pm$ 16,07
PTC (%)	0,34 $\pm$ 0,07	0,34 $\pm$ 0,09

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

**TABLA 32.** PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS (PERFIL LEUCOCITARIO), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES (%).

	<b>Control</b> (n=43)	<b>Alergia</b> (n=78)	<b>Intolerancia</b> (n=15)
Neutrófilos	25,04±12,18	24,13±10,11	21,89±8,88
Linfocitos	60,95±13,14	60,64±11,57	59,86±12,77
Monocitos	7,44±3,19	7,16±3,12	8,17±2,89
Eosinófilos	4,82±3,77	5,83±3,32	5,46±4,30
Basófilos	1,05±0,51	1,03±0,58	0,92±0,45

Valores expresados como media ± desviación estándar

**TABLA 33.** PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS (FÓRMULA LEUCOCITARIA), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES ( $\times 10^9/l$ ).

	<b>Control</b> (n=43)	<b>Alergia</b> (n=78)	<b>Intolerancia</b> (n=15)
Leucocitos	9,78±2,40	10,38±2,77	10,17±2,03
Neutrófilos	2,43±1,34	2,51±1,29	2,21±0,93
Linfocitos	5,98±2,10	6,32±2,06	6,33±1,78
Monocitos	0,73±0,40	0,73±0,34	0,81±2,97
Eosinófilos	0,46±0,40	0,59±0,36	0,56±0,46
Basófilos	0,10±0,05	0,106±0,06	0,09±0,04

Valores expresados como media ± desviación estándar

**TABLA 34.** PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS (PERFIL LEUCOCITARIO), EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS E INTOLERANTES) (%).

	<b>Control</b> (n=43)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=93)
Leucocitos	9,78±2,40	10,35±2,66
Neutrófilos	25,04±12,18	23,79±9,82
Linfocitos	60,95±13,14	60,39±11,63
Monocitos	7,44±3,20	7,32±3,07
Eosinófilos	4,82±3,77	5,75±3,46
Basófilos	1,05±0,51	1,01±0,55

Valores expresados como media ± desviación estándar

**TABLA 35.** PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS (FÓRMULA LEUCOCITARIA), EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS E INTOLERANTES) ( $\times 10^9/l$ ).

	<b>Control</b> (n=43)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=93)
Neutrófilos	2,43±1,34	2,47±1,24
Linfocitos	5,98±2,10	6,31±1,99
Monocitos	0,73±0,40	0,74±0,33
Eosinófilos	0,46±0,40	0,59±0,37
Basófilos	0,10±0,05	0,10±0,06

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

**TABLA 36.** SUBPOBLACIONES CELULARES EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES (%).

	<b>Control</b> (n=44)	<b>Alergia</b> (n=78)	<b>Intolerancia</b> (n=16)
CD2	61,94±10,44	61,85±9,08	64,35±8,78
CD3	58,87±10,23	58,17±9,78	61,13±10,93
CD4	38,45±9,10	38,94±9,04	41,04±10,86
CD8	18,36±6,67	18,17±5,32	18,26±5,38
CD19	22,83±7,59	23,35±6,34	24,36±7,56
CD56	5,02±3,57	5,21±2,73	5,54±2,50
$\gamma\delta$ TCR	3,94±2,35	3,32±1,66	3,87±2,29
$\gamma\delta$ TCR CD8	0,89±0,96	0,65±0,85	0,58±0,77
CD4/CD8	2,21±0,87	2,34±0,88	2,41±0,93
CD2/CD19	3,12±1,28	2,91±1,03	2,98±1,15
CD3/CD19	2,90±1,19	2,72±0,96	2,80±1,08

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar



**TABLA 37.** SUBPOBLACIONES CELULARES EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES (cel/ml).

	<b>Control</b> (n=42)	<b>Alergia</b> (n=76)	<b>Intolerancia</b> (n=15)
CD2	3645±1377	3916±1367	3724±1732
CD3	3497±1348	3642±1379	3933±1618
CD4	2258±896	2443±913	2559±1070
CD8	1086±685	1173±569	1222±636
CD19	1385±726	1489±773	1538±527
CD56	283±210	333±195	352±217

Valores expresados como media ± desviación estándar

**TABLA 38.** SUBPOBLACIONES CELULARES EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS E INTOLERANTES) (%).

	<b>Control</b> (n=44)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=94)
CD2	61,94±10,44	62,27±9,02
CD3	58,87±10,23	58,67±9,99
CD4	38,45±9,10	39,29±9,34
CD8	18,36±6,67	18,18±5,29
CD19	22,83±7,59	23,53±6,53
CD56	5,02±3,57	5,26±2,68
TCR total	3,94±2,35	3,41±1,78
TCR CD8*	0,89±0,96	0,64±0,83
CD4/CD8	2,21±0,87	2,35±0,88
CD2/CD19	3,12±1,28	2,92±1,05
CD3/CD19	2,90±1,19	2,73±0,98

Valores expresados como media ± desviación estándar

\*Diferencias significativas entre controles y pacientes (Mann-Whitney;  $p < 0,05$ )

**TABLA 39.** SUBPOBLACIONES CELULARES EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS E INTOLERANTES) (cel/ml).

	<b>Control</b> (n=44)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=94)
CD2	3645±1377	3883±1426
CD3	3497±1348	3690±1415
CD4	2258±896	2462±935
CD8	1086±685	1181±577
CD19	1385±726	1498±735
CD56*	283±210	336±198

Valores expresados como media ± desviación estándar

\*Diferencias significativas entre controles y pacientes (Mann-Whitney;  $p < 0,05$ )**TABLA 40.** SECRECIÓN DE CITOQUINAS “*IN VIVO*” EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=39)	<b>Alergia</b> (n=63)	<b>Intolerancia</b> (n=13)
IL2	0,77±1,61	0,89±2,18	0,32±1,14
IFN- $\gamma$	1,07±2,47	2,98±13,64	0,89±1,77
IL4	0,38±0,71	0,37±0,78	0,11±0,39
IL5*	2,93±8,65 <sup>ab</sup>	2,27±2,26 <sup>b</sup>	1,27±0,86 <sup>a</sup>
IL10	1,64±1,79	1,91±4,68	4,47±12,53
TNF- $\alpha$	0,88±1,13	0,74±1,00	0,84±0,97

Valores expresados como media ± desviación estándar

\*Diferencias significativas entre controles, alérgicos e intolerantes (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ).<sup>ab</sup>Diferencias significativas entre pares de grupos (test pares de Mann-Whitney;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 40A.** SECRECIÓN DE CITOQUINAS “*IN VIVO*” EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=39)		<b>Alergia</b> (n=63)		<b>Intolerancia</b> (n=13)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
IL2	0	0-0	0	0-0	0	0-0
IFN- $\gamma$	0	0-0	0	0-0	0	0-1,25
IL4	0	0-0	0	0-0	0	0-0
IL5	1,70	1,12-2,00	1,91	1,30-2,40	1,40	0,64-1,65
IL10	1,35	0-3,2	0	0-2,37	1,30	0-2,50
TNF- $\alpha$	0	0-2,00	0	0-1,60	0	0-1,75

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 41.** SECRECIÓN DE CITOQUINAS “*IN VIVO*” EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS E INTOLERANTES) (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=39)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=76)
IL2	0,77 $\pm$ 1,61	0,79 $\pm$ 2,05
IFN- $\gamma$	1,07 $\pm$ 2,47	2,62 $\pm$ 12,44
IL4	0,38 $\pm$ 0,71	0,32 $\pm$ 0,73
IL5	2,93 $\pm$ 8,65	2,10 $\pm$ 2,11
IL10	1,64 $\pm$ 1,79	2,35 $\pm$ 6,64
TNF- $\alpha$	0,88 $\pm$ 1,13	0,76 $\pm$ 0,99

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

**TABLA 41A.** SECRECIÓN DE CITOQUINAS “*IN VIVO*” EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS E INTOLERANTES) (pg/ml).

	Control (n=39)		Alergia + Intolerancia (n=76)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
IL2	0	0-0	0	0-0
IFN- $\gamma$	0	0-0	0	0-0
IL4	0	0-0	0	0-0
IL5	1,70	1,12-2,00	1,71	1,29-2,37
IL10	1,35	0-3,2	0,55	0-2,35
TNF- $\alpha$	0	0-2,00	0	0-1,60

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 42.** PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$  POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES (pg/ml).

	Control <sup>#</sup> (n=42)	Alergia <sup>#</sup> (n=75)	Intolerancia (n=12)
Medio	289,0 $\pm$ 1059,46 <sup>1</sup>	46,62 $\pm$ 166,36 <sup>1</sup>	7,74 $\pm$ 12,85
PHA	1204 $\pm$ 2960 <sup>2</sup>	2292 $\pm$ 4212 <sup>2</sup>	2829 $\pm$ 7441
Caseína	143,4 $\pm$ 442,8 <sup>1</sup>	67,95 $\pm$ 264,4 <sup>3</sup>	75,70 $\pm$ 134,9
BLG	162,4 $\pm$ 335,2 <sup>1</sup>	134,9 $\pm$ 359,9 <sup>3</sup>	55,45 $\pm$ 78,54

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

Dentro de cada grupo de niños de estudio:

<sup>#</sup>Diferencias significativas dentro de los distintos alérgenos ( $\chi^2$  de Friedman;  $p < 0,05$ ).

<sup>123</sup>Diferencias significativas entre pares de alérgenos (test pares de Wilcoxon;  $p < 0,05$ ).

TABLA 42A. IFN- $\gamma$  (pg/ml)

	Control (n=42)		Alergia (n=75)		Intolerancia (n=12)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	0	0-15,45	0	0-13,80	0	0-20,05
PHA	330	118-1088	484,70	98,30-1424	45,60	0-904,5
Caseína	7,25	0-36,17	10,70	0-28,00	3,95	0-164,2
BLG	25,3	3,90-143,5	24,8	4,2-59,50	18,00	3,9-118,2

RIQ: Rango intercuartil

TABLA 43. PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$  POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO) EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS/INTOLERANTES) (pg/ml).

	Control (n=42)	Alergia + Intolerancia (n=87)
Medio	289,0 $\pm$ 1059	41,26 $\pm$ 154,9
PHA	1204,7 $\pm$ 2960	2364 $\pm$ 4711
Caseína	143,4 $\pm$ 442,8	69,01 $\pm$ 249,9
BLG	162,4 $\pm$ 335,2	121,67 $\pm$ 330,4

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándarTABLA 43A. IFN- $\gamma$  (pg/ml).

	Control (n=42)		Alergia + Intolerancia (n=87)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	0	0-15,4	0	0-13,8
PHA	330	118-1088	443	83,2-1371
Caseína	7,25	0-36,17	10,4	0-28,3
BLG	25,3	33,9-143,47	24,8	4,7-75,15

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 44.** PRODUCCIÓN DE IL-2 POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES (pg/ml).

	<b>Control<sup>#</sup></b> (n=41)	<b>Alergia<sup>#</sup></b> (n=74)	<b>Intolerancia<sup>#</sup></b> (n=12)
Medio	12,81±31,71 <sup>1</sup>	35,91±205,89 <sup>1</sup>	12,57±24,45 <sup>1</sup>
PHA	265,1±346,9 <sup>2</sup>	398,1±593,9 <sup>2</sup>	304,6±659,1 <sup>2</sup>
Caseína *	12,38±39,41 <sup>1a</sup>	18,99±35,28 <sup>3a</sup>	280,7±845,7 <sup>12b</sup>
BLG	12,19±21,48 <sup>1</sup>	15,04±22,39 <sup>1</sup>	5,42±6,50 <sup>1</sup>

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

\*Diferencias significativas entre controles, alérgicos e intolerantes (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ).

<sup>a,b</sup>Diferencias significativas entre grupos (test pares Mann-Whitney;  $p < 0,05$ ).

Dentro de cada grupo de niños de estudio:

<sup>#</sup>Diferencias significativas dentro de los distintos alergenos ( $\chi^2$  de Friedman;  $p < 0,05$ ).

<sup>12</sup>Diferencias significativas entre pares de alergenos (test pares de Wilcoxon;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 44A.** IL-2 (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=41)		<b>Alergia</b> (n=74)		<b>Intolerancia</b> (n=12)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	2,90	0-7,4	6,15	0-15,7	4,00	0-12,9
PHA	120,3	48,4-282,2	124,2	31,9-485,5	43,50	17,4-103,8
caseína	2,20	0-9,8	6,20	0-19,17	9,75	2,5-31,6
BLG	5,10	1,9-9,6	8,30	0-13,8	3,00	0-13,12

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 45.** PRODUCCIÓN DE IL-2 POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO), EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS/INTOLERANTES) (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=42)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=85)
Medio	12,81 $\pm$ 31,71	32,89 $\pm$ 192,3
PHA	265,1 $\pm$ 346,9	384,3 $\pm$ 600,5
Caseína*	12,38 $\pm$ 39,41	52,55 $\pm$ 304,0
BLG	12,19 $\pm$ 21,48	13,29 $\pm$ 20,69

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

\*Diferencias significativas entre pacientes (alérgicos e intolerantes) y controles (test pares de Mann-Whitney;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 45A.** IL-2 (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=42)		<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=87)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	2,90	0-7,4	4,8	0-15,4
PHA	120,3	48,4-282,2	105,9	30,6-447,7
Caseína	2,2	0-9,8	7,0	0-19,2
BLG	5,1	1,9-9,6	7,5	0-13,2

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 46.** PRODUCCIÓN DE IL-4 POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES (pg/ml).

	<b>Control<sup>#</sup></b> (n=42)	<b>Alergia<sup>#</sup></b> (n=74)	<b>Intolerancia<sup>#</sup></b> (n=11)
Medio	5,91±15,49 <sup>1</sup>	4,04±10,43 <sup>1</sup>	2,90±4,05 <sup>1</sup>
PHA	46,67±60,94 <sup>2</sup>	54,90±76,43 <sup>2</sup>	23,40±16,50 <sup>2</sup>
Caseína	4,24±10,62 <sup>1</sup>	5,06±13,44 <sup>1</sup>	6,65±12,91 <sup>1</sup>
BLG	8,06±17,46 <sup>1</sup>	8,70±16,81 <sup>1</sup>	2,62±2,86 <sup>1</sup>

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

Dentro de cada grupo de niños de estudio:

<sup>#</sup>Diferencias significativas dentro de los distintos alergenos ( $\chi^2$  de Friedman;  $p < 0,05$ ).

<sup>12</sup>Diferencias significativas entre pares de alergenos (test pares de Wilcoxon;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 46A.** IL-4 (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=42)		<b>Alergia</b> (n=74)		<b>Intolerancia</b> (n=11)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	1,4	0-3,02	1,5	0-3,52	0	0-7,90
PHA	22,15	13,27-56,10	32,0	13,40-53,90	22,25	9,12-40,27
Caseína	1,6	0-3,70	2,1	0-5,95	2,6	1,40-6,20
BLG	2,45	0-5,82	4,7	1,55-7,07	1,8	1,12-3,85

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 47.** PRODUCCIÓN DE IL-4 POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO) EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS/INTOLERANTES) (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=42)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=80)
Medio	5,91±15,49	3,90±9,83
PHA	46,67±60,94	50,18±71,56
Caseína	4,24±10,62	5,27±13,31
BLG	8,06±17,46	7,59±15,37

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar



TABLA 47A. IL-4

	Control (n=42)		Alergia + Intolerancia (n=87)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	1,45	0-3	1,50	0-3,55
PHA	22,15	13,3-56,10	28,10	12,5-49,35
Caseína	1,60	0-3,7	2,10	0-5,97
BLG	2,45	0-5,8	3,05	1,5-6,82

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 48.** PRODUCCIÓN DE IL-5 POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES (pg/ml).

	Control <sup>#</sup> (n=42)	Alergia <sup>#</sup> (n=74)	Intolerancia <sup>#</sup> (n=11)
Medio	3,48± 7,71 <sup>1</sup>	3,71± 6,50 <sup>1</sup>	1,45± 1,80 <sup>1</sup>
PHA *	153,7± 182,6 <sup>2a</sup>	581,37± 902,6 <sup>2b</sup>	340,7± 448,7 <sup>2b</sup>
Caseína	3,54± 7,59 <sup>1</sup>	7,01± 11,95 <sup>3</sup>	26,66± 70,99 <sup>3</sup>
BLG	4,04± 4,25 <sup>1</sup>	5,68± 9,03 <sup>1</sup>	2,97± 2,69 <sup>13</sup>

Valores expresados como media ± desviación estándar

\*Diferencias significativas entre controles, alérgicos e intolerantes (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ).

<sup>a,b</sup>Diferencias significativas entre grupos (test pares de Mann-Whitney;  $p < 0,05$ ).

Dentro de cada grupo de niños de estudio:

<sup>#</sup>Diferencias significativas dentro de los distintos alérgenos ( $\chi^2$  de Friedman;  $p < 0,05$ ).

<sup>123</sup>Diferencias significativas entre pares de alérgenos (test pares de Wilcoxon;  $p < 0,05$ ).

TABLA 48A. IL-5 (pg/ml).

	Control (n=42)		Alergia (n=74)		Intolerancia (n=11)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	1,35	0-3,1	1,60	0-4	1,40	0-2,30
PHA	65,10	33,9-315,5	319,45	92,8-745,8	203,70	85,8-358,2
Caseína	1,20	0-4,3	2,60	0,5-6,35	3,60	0-9,75
BLG	2,95	1,6-4,55	2,30	1,3-6,1	2,15	1,4-4,75

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 49.** PRODUCCIÓN DE IL-5 POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO) EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS/INTOLERANTES) (pg/ml).

	Control (n=42)	Alergia + Intolerancia (n=85)
Medio	3,48 $\pm$ 7,71	3,42 $\pm$ 6,14
PHA	153,7 $\pm$ 182,6	492,5 $\pm$ 773,2
Caseína *	3,54 $\pm$ 7,59	9,50 $\pm$ 27,37
BLG	4,04 $\pm$ 4,25	5,18 $\pm$ 8,27

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

\*Diferencias significativas entre controles y pacientes (test pares de Mann-Whitney;  $p < 0,05$ ).

TABLA 49A. IL-5 (pg/ml).

	Control (n=42)		Alergia + Intolerancia (n=87)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	1,35	0-3,10	1,60	0-3,75
PHA	65	33,9-315,5	292	89,8-616,9
Caseína	1,20	0-4,30	2,70	0-6,70
BLG	2,95	1,6-4,55	2,30	1,3-6,10

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 50.** PRODUCCIÓN DE IL-10 POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES (pg/ml).

	<b>Control<sup>#</sup></b> (n=42)	<b>Alergia<sup>#</sup></b> (n=74)	<b>Intolerancia</b> (n=9)
Medio	32,85±60,83 <sup>1</sup>	28,41±74,98 <sup>1</sup>	19,80±28,67
PHA	142,4±160,5 <sup>2</sup>	185,30±236,6 <sup>2</sup>	127,9±150,7
Caseína	104,9±150,7 <sup>3</sup>	113,47±191,3 <sup>3</sup>	74,73±61,55
BLG	111,9±101,5 <sup>4</sup>	216,31±284,6 <sup>4</sup>	90,32±66,08

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

Dentro de cada grupo de niños de estudio:

<sup>#</sup>Diferencias significativas dentro de los distintos alérgenos ( $\chi^2$  de Friedman;  $p < 0,05$ ).

<sup>1234</sup>Diferencias significativas entre pares de alérgenos (test pares de Wilcoxon;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 50A.** IL-10 (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=42)		<b>Alergia</b> (n=74)		<b>Intolerancia</b> (n=9)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	4,70	1,65-37,87	3,55	0-7,82	1,70	0,7-52,0
PHA	91,20	41,42-171,1	98,70	58,77-203,7	82,70	23,75-175,6
Caseína	49,0	6,90-176,8	37,75	6,82-121,5	78,75	10,82-135,9
BLG	99,0	19,90-174,3	92,20	35,50-209,2	73,20	36,85-152,3

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 51.** PRODUCCIÓN DE IL-10 POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO) EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS/INTOLERANTES) (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=42)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=83)
Medio	32,85±60,83	27,47±71,36
PHA	142,4±160,5	178,7±228,4
Caseína	104,9±150,7	109,5±182,4
BLG	111,9±101,5	196,6±265,8

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

**TABLA 51A.** IL-10 (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=42)		<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=87)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	4,70	1,6-37,8	3,30	0-8,2
PHA	91,2	41,4-171	96,8	58,4-202,4
Caseína	49,0	6,9-176	42,9	7,1-121,6
BLG	99,0	19,9-174	91,3	38,7-182,2

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 52.** PRODUCCIÓN DE TNF- $\alpha$  POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES (pg/ml).

	<b>Control<sup>#</sup></b> (n=42)	<b>Alergia<sup>#</sup></b> (n=75)	<b>Intolerancia</b> (n=12)
Medio	380,4±994,4 <sup>1</sup>	227,52±723,1 <sup>1</sup>	178,2±407,3
PHA	1937±1776 <sup>2</sup>	2509±2352 <sup>2</sup>	1945±2747
Caseína	603,8± 797,4 <sup>3</sup>	696,9± 1050,9 <sup>3</sup>	1050± 1179
BLG	1110± 1136 <sup>23</sup>	1115± 1016 <sup>4</sup>	1793± 1813

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

Dentro de cada grupo de niños de estudio:

<sup>#</sup>Diferencias significativas dentro de los distintos alérgenos ( $\chi^2$  de Friedman;  $p < 0,05$ ).

<sup>1234</sup>Diferencias significativas entre pares de alérgenos (test pares de Wilcoxon;  $p < 0,05$ ).

TABLA 52A. TNF- $\alpha$  (pg/ml).

	Control (n=42)		Alergia (n=75)		Intolerancia (n=12)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	16,60	4,45-147,2	18,20	4,72-106,3	15,90	2,85-136,5
PHA	1171	508,4-3512	1894	954,3-3224	450,1	172,7-4625
Caseína	350,5	37,80-733-4	252,5	82,05-784,8	726,9	211,6-1421
BLG	604,4	289,2-1842	841,2	334,1-1620	1934,8	203,6-3312

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 53.** PRODUCCIÓN DE TNF- $\alpha$  POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO) EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS/INTOLERANTES) (pg/ml).

	Control (n=42)	Alergia + Intolerancia (n=83)
Medio	380,4 $\pm$ 994,4	222,1 $\pm$ 694,2
PHA	1937 $\pm$ 1776	2440 $\pm$ 2392
Caseína	603,8 $\pm$ 797,3	733,1 $\pm$ 1061
BLG	1110 $\pm$ 1136	1224 $\pm$ 1168

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándarTABLA 53A. TNF- $\alpha$  (pg/ml).

	Control (n=42)		Alergia + Intolerancia (n=87)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	16,6	4,45-147	16,5	4,8-108,9
PHA	1171,1	508-3512	1706,1	708-3394
Caseína	350,5	37,8-733	266,8	85,4-832
BLG	604,4	289-1842	858,2	357-1713

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 54.** PRODUCCIÓN DE IL-1 POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES (pg/ml).

	<b>Control<sup>#</sup></b> (n=26)	<b>Alergia<sup>#</sup></b> (n=47)	<b>Intolerancia<sup>#</sup></b> (n=9)
Medio	129,3±202,4 <sup>1</sup>	120,7±226,5 <sup>1</sup>	58,39±100,5 <sup>1</sup>
PHA	455,2±925,1 <sup>2</sup>	410,5±698,5 <sup>2</sup>	309,6±227,9 <sup>2</sup>
Caseína	392,5±296,1 <sup>2</sup>	392,2±395,5 <sup>3</sup>	672,4±738,0 <sup>2</sup>

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

Dentro de cada grupo de niños de estudio:

<sup>#</sup>Diferencias significativas dentro de los distintos alérgenos ( $\chi^2$  de Friedman;  $p < 0,05$ ).

<sup>123</sup>Diferencias significativas entre pares de alérgenos (test pares de Wilcoxon;  $p < 0,05$ ).

**TABLA 54A.** IL-1 (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=26)		<b>Alergia</b> (n=47)		<b>Intolerancia</b> (n=9)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	28,37	2,84-184,9	21,88	2,28-142,4	10,00	0,66-125,1
PHA	123,39	38,41-334,6	109,8	44,09-387,6	208,3	172,8-508,8
Caseína	330,35	212,1-575,7	236,1	87,81-677,3	344,5	90,40-1418

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 55.** PRODUCCIÓN DE IL-1 POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO) EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS/INTOLERANTES) (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=26)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=56)
Medio	129,3±202,4	110,7±211,9
PHA	455,2±925,1	397,9±657,7
Caseína	392,5±296,1	417,6±434,6

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

**TABLA 55A.** IL-1 (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=42)		<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=87)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	28,37	2,8-184,9	16,84	1,8-133
PHA	123,4	38,4-334,6	132,8	45,7-388,9
Caseína	330	212-575	236	93,3-679

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 56.** PRODUCCIÓN DE IL-6 POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES (pg/ml).

	<b>Control<sup>#</sup></b> (n=26)	<b>Alergia<sup>#</sup></b> (n=47)	<b>Intolerancia<sup>#</sup></b> (n=9)
Medio	338,8 $\pm$ 533,3 <sup>1</sup>	262,5 $\pm$ 409,6 <sup>1</sup>	162,3 $\pm$ 154,9 <sup>1</sup>
PHA	7073 $\pm$ 7577 <sup>2</sup>	5619 $\pm$ 6124 <sup>2</sup>	5877 $\pm$ 7459 <sup>2</sup>
Caseína	5979 $\pm$ 6658 <sup>2</sup>	5475 $\pm$ 6465 <sup>2</sup>	5925 $\pm$ 5474 <sup>2</sup>

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

Dentro de cada grupo de niños de estudio:

<sup>#</sup>Diferencias significativas dentro de los distintos alérgenos ( $\chi^2$  de Friedman;  $p < 0,05$ ).<sup>12</sup>Diferencias significativas entre pares de alérgenos (test pares de Wilcoxon;  $p < 0,05$ ).**TABLA 56A.** IL-6 (pg/ml)

	<b>Control</b> (n=26)		<b>Alergia</b> (n=47)		<b>Intolerancia</b> (n=9)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	54,38	18,40-426,5	58,29	28,96-357,9	100,5	56,41-205,0
PHA	4464	1670-8885	3076	1400-8196	3587	1146-7955
Caseína	2537	683,6-13046	2551	524,7-7938	3011	1090-12499

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 57.** PRODUCCIÓN DE IL-6 POR PBMC ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO) EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS/INTOLERANTES) (pg/ml).

	<b>Control</b> (n=26)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=51)
Medio	338,8 $\pm$ 533,3	247,9 $\pm$ 383,6
PHA	7073 $\pm$ 7577	5654 $\pm$ 6240
Caseína	5979 $\pm$ 6658	5537 $\pm$ 6290

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

**TABLA 57A.** IL-6 (pg/ml)

	<b>Control</b> (n=42)		<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=87)	
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
Medio	54,4	18,3-426,5	75,3	30,6-334,5
PHA	4464	1670-8885	3123	1375-8035
Caseína	2537	683,7-13046	2620	611-9908

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 58.** PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), CON ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES, EXPRESADO EN CUENTAS POR MINUTO, (CPM).

	<b>Control<sup>#</sup></b> (n=32)	<b>Alergia<sup>#</sup></b> (n=68)	<b>Intolerancia<sup>#</sup></b> (n=13)
Medio	1601,5 $\pm$ 3759,96 <sup>1</sup>	1196,95 $\pm$ 2505,74 <sup>1</sup>	643,13 $\pm$ 803,98 <sup>1</sup>
PHA	40539,3 $\pm$ 37874,02 <sup>2</sup>	41225,5 $\pm$ 36985,56 <sup>2</sup>	54240,87 $\pm$ 46197,38 <sup>2</sup>
Caseína	2010,67 $\pm$ 3427,27 <sup>3</sup>	2349,07 $\pm$ 4209,8 <sup>3</sup>	1497,41 $\pm$ 2038,55 <sup>3</sup>
BLG	1935,33 $\pm$ 4236,52 <sup>13</sup>	2758,28 $\pm$ 7505,4 <sup>1</sup>	480,27 $\pm$ 539,24 <sup>1</sup>

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

Dentro de cada grupo de niños de estudio:

<sup>#</sup>Diferencias significativas dentro de los distintos alérgenos ( $\chi^2$  de Friedman;  $p < 0,05$ ).

<sup>12</sup>Diferencias significativas entre pares de alérgenos (test pares de Wilcoxon;  $p < 0,05$ ).



**TABLA 58A.** PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), CON ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES, EXPRESADO EN CUENTAS POR MINUTO, (CPM).

	<b>Control</b> (n=39)		<b>Alergia</b> (n=68)		<b>Intolerancia</b> (n=13)	
	<i>Mediana</i>	<b>RIQ</b>	Mediana	<b>RIQ</b>	Mediana	<b>RIQ</b>
Medio	293,16	199,7-927,62	234,00	143,9-821,7	265,70	139,3-1143,7
PHA	26477	12165,7-71897,5	30763,3	12283,7-62319,5	48513,0	15221-76998,5
Caseína	599,25	237,5-1851,9	662,33	308,2-2806,6	426,00	221,0-3018,5
BLG	303,83	177,08-1528,41	451,83	177,08-1528,41	274,83	126,7-721,7

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 59.** PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), CON ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES, EXPRESADO COMO ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN (SI).

	<b>Control</b> (n=32)	<b>Alergia</b> (n=68)	<b>Intolerancia</b> (n=13)
PHA	127,33 $\pm$ 155,39	147,80 $\pm$ 170,37	215,31 $\pm$ 230,19
Caseína	2,44 $\pm$ 3,29	4,69 $\pm$ 11,01	5,49 $\pm$ 12,80
BLG	1,08 $\pm$ 0,62	7,40 $\pm$ 22,12	1,13 $\pm$ 0,41

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

**TABLA 59A.** PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), CON ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO DE CULTIVO), EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES, EXPRESADO COMO ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN (SI).

	<b>Control</b> (n=32)		<b>Alergia</b> (n=68)		<b>Intolerancia</b> (n=13)	
	<b>Median</b>	RIQ	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ
PHA	57,24	15,00-182,40	76,19	10,90-253,62	68,91	19,53-437,16
Caseína	1,58	0,92-2,16	1,82	1,14-4,37	1,54	1,24-2,31
BLG	1,07	0,53-1,61	1,27	0,80-1,97	1,07	0,78-1,45

RIQ: Rango intercuartil

**TABLA 60.** PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), CON ALERGENO CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG), O SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO DE CULTIVO), EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS E INTOLERANTES), EXPRESADO EN CUENTAS POR MINUTO, (CPM).

	<b>Control</b> (n=32)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=81)
Medio	1601,51 $\pm$ 3759,96	1108,06 $\pm$ 2323,20
PHA	40539,32 $\pm$ 37874,02	43314,39 $\pm$ 38586,03
Caseína	2010,67 $\pm$ 3427,27	2225,80 $\pm$ 3970,99
BLG	1935,33 $\pm$ 4236,52	2413,13 $\pm$ 6955,75

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

**TABLA 61.** PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON MITÓGENO (PHA), CON ALERGENO: CASEÍNA,  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (BLG) O, SIN ESTIMULACIÓN (MEDIO), EN CONTROLES Y PACIENTES (ALÉRGICOS E INTOLERANTES), EXPRESADO COMO ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN (SI).

	<b>Control</b> (n=32)	<b>Alergia + Intolerancia</b> (n=81)
PHA	127,33 $\pm$ 155,39	158,77 $\pm$ 181,46
Caseína	2,44 $\pm$ 3,29	4,80 $\pm$ 11,20
BLG	1,08 $\pm$ 0,62	6,38 $\pm$ 20,33

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar

## 5.- DISCUSIÓN

### 5.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES

#### Sexo

Como se puede observar en la Tabla 1, el porcentaje de niños y niñas es invertido entre el grupo de alérgicos e intolerantes. Hay más niñas entre los alérgicos (54,4%) mientras que tanto en intolerantes como en controles predominan los niños: 62,5% y 61,4%, respectivamente. Sin embargo, las diferencias en cuanto al sexo no son significativas. Estos resultados coinciden con los de otros estudios llevados a cabo en España (Lebrero y col. 2001; Bousoño y col., 1999). En Dinamarca, Host y Halcken (1990) en un estudio de cohorte en 1749 recién nacidos seguidos durante 3 años de vida, no encuentran diferencias en cuanto al sexo. Únicamente en 2 de los estudios revisados, se observa el resultado contrario, más niños que niñas alérgicas: con 61% de niños frente a un 39% de niñas con alergia. Sin embargo, hay que tener en cuenta las distintas poblaciones consideradas en estos estudios. En uno de ellos la población de estudio está constituida únicamente por los niños con IgE específica positiva, no incluyendo a aquellos con pruebas positivas al test *prick* cutáneo (Andrés de Llano y col., 1997). En el otro estudio se consideraron alérgicos los niños con resultados positivos tanto en las pruebas cutáneas como en los valores de IgE específica (Korol y Kaczmariski, 2001).

#### Evolución

Como se ha indicado en el apartado correspondiente, el tratamiento de la alergia/intolerancia a las proteínas de la leche de vaca se basa en la dieta de exclusión, sustituyendo este aporte lácteo por hidrolizado de proteínas lácteas hasta nueva indicación. Estos pacientes con alergia/intolerancia vuelven a revisión tras un tiempo con dieta exenta de proteínas de la leche. En este estudio reflejamos el resultado de este seguimiento sólo en un 67,4% de los pacientes diagnosticados de alergia o de intolerancia. Algunos niños presentaron reacción adversa tras contacto accidental con el alérgeno, retrasándose por ello, especialmente en los niños con síntomas más acusados, las pruebas de reprovocación oral.

En el seguimiento de los pacientes y tras las pruebas de reprovocación oral con el alimento causante de la alergia o intolerancia, se observa distinta evolución entre ambos grupos (Tabla 2). En este sentido, se ha encontrado que un 45,5% de pacientes con intolerancia desarrollan tolerancia a la leche, frente a sólo un 13,2% de niños alérgicos que se vuelven tolerantes. Además, se observa que un porcentaje elevado de niños intolerantes (45,5%) desarrolla alergia a las proteínas de la leche. Se han señalado resultados similares en un estudio retrospectivo llevado a cabo por Bousoño y col. (1999) en 89 pacientes que habían sufrido reacción adversa a alimentos. En el 90% de los casos, el agente causante es la leche de vaca, seguido del huevo (32%) y de la soja (20%). En este estudio, la proporción de niños intolerantes que desarrollan tolerancia al año fue de un 70%, mientras que en alérgicos fue de un 12%.

Carroccio y col. (2000) en el seguimiento de 86 niños de entre 15 días y 32 meses (edad media de 4 meses) con alergia/intolerancia a las proteínas de la leche durante 40 meses, observan que los porcentajes de niños que desarrollan tolerancia son de 30%, 54,5% y 70% después de 1, 2 y 3 años, respectivamente. Al final de este periodo de seguimiento, en 26/86 niños, persiste la enfermedad; estos niños eran los que presentaron al diagnóstico valores más altos de IgE sérica total, IgE específica y mayor respuesta al test cutáneo tipo *prick* que el resto de los niños. En este estudio los autores se refieren a niños con intolerancia a las proteínas de la leche, a niños con pruebas de provocación positivas independientemente de los resultados de las pruebas inmunológicas. De los 86 pacientes con provocación positiva, un 42% muestra respuesta positiva al *prick* test cutáneo y un 46,5% valores séricos de IgE específica positivos frente a la leche de vaca o sus proteínas.

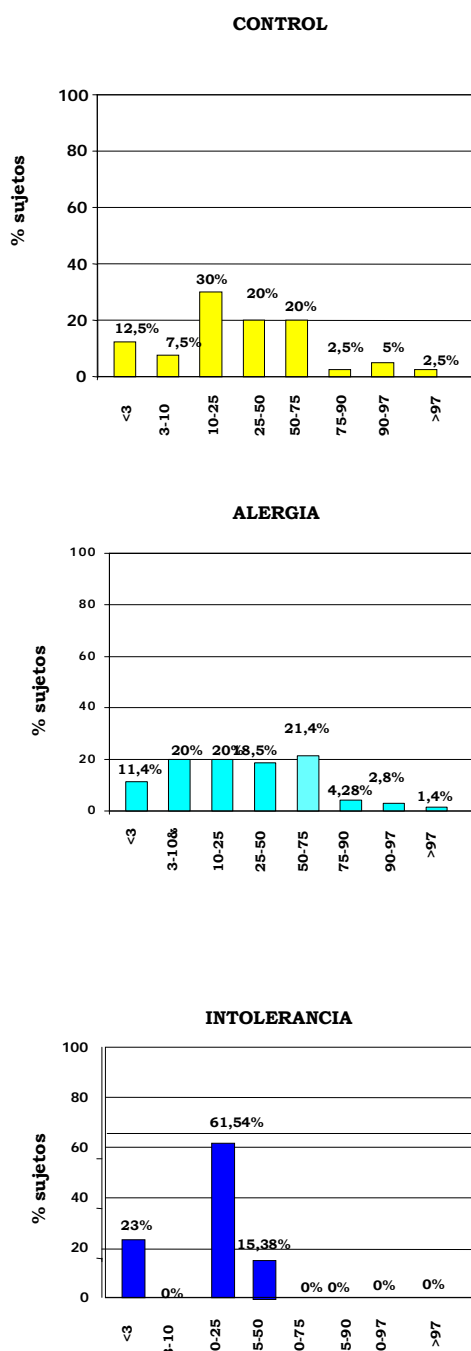
## 5.2.- PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS

### Edad, Peso, Zscore Peso, Altura, Índice de Masa Corporal (IMC)

Dentro de los parámetros antropométricos estudiados, en relación a la edad y a la altura no hay diferencias significativas entre controles, alérgicos e intolerantes (Tabla 3). Sin embargo, en cuanto al peso y al índice de masa corporal, sí se observan diferencias entre los 3 grupos y en concreto, entre los niños alérgicos y los intolerantes. Además, al

comparar los grupos de forma más precisa, se observa que el peso de los niños alérgicos se aleja menos del valor correspondiente al P50 (P-P50). En ambos grupos es un valor negativo, pero más alto en valor absoluto para los niños intolerantes (el peso de los niños intolerantes se aleja más del Percentil 50). También hay diferencias en cuanto al *Zscore* del peso entre niños con alergia o intolerancia a la leche de vaca.

**GRÁFICO 1. DISTRIBUCIÓN POR PERCENTILES DEL IMC**



Por otra parte, al comparar el IMC con los datos de la población española (Hérmendez y Sastre, 1999), los niños del grupo control presentan una distribución de carácter más normal que los alérgicos y sobretodo, que los intolerantes. Hasta un 61,5% de los niños intolerantes presentan un IMC entre el percentil 10 y el percentil 25. Además, no hay ningún niño dentro de los intolerantes con IMC entre los percentiles 50 y 90, y tan sólo un 15% de estos niños presentan valores de IMC entre los percentiles 25 y 50 (Gráfico 1).

Al considerar al grupo de pacientes con alergia/intolerancia en su conjunto y compararlo con controles, no se observan diferencias en ninguno de los parámetros antropométricos anteriores (Tabla 4).

Por otra parte, al estudiar la distribución por intervalos de edades tanto del total de niños del estudio (Tabla 5), como dentro de cada grupo (Tabla 6), no se observan diferencias en ninguno de los 2 casos.

Pocos estudios en niños con alergia/intolerancia a las proteínas de la leche llevan a cabo determinaciones antropométricas. Únicamente en la valoración del estado nutricional de niños alérgicos con dietas de exclusión en determinados alimentos pero que generalmente se trata de niños más mayores.

Así, Tianinin y col. (1995) en niños de 2 años encuentran que el parámetro altura para la edad es menor para los niños alérgicos que para los controles (-0,6 vs -0,2). En otro estudio se evalúa el estado nutricional de 19 niños mediante un seguimiento durante la dieta de exclusión. Al principio del estudio se observa que los niños alérgicos presentaban un pequeño retraso en el crecimiento (Paganus y col., 1992).

En otro estudio Christie y col. (2002) con el fin de evaluar posibles alteraciones en el crecimiento de niños con alergias alimentarias determinan la altura, el peso, el IMC en 98 niños (media de edad de  $3,7 \pm 2,3$  años) y en 99 controles sanos (media de edad de  $4,1 \pm 2,4$  años). Además, la estimación de la ingesta de energía y nutrientes se lleva a cabo mediante encuestas de recuerdo de 3 días. En relación a la altura, los resultados indican que los niños con alergia a más de un alimento son más bajos en relación a los percentiles de la altura para la edad que los que presentaban alergia a un único alimento. Los autores

concluyen que los niños con alergia a la leche o a múltiples alimentos presentan un mayor riesgo de padecer trastornos en el crecimiento o una ingesta inadecuada de nutrientes.

## **5.3.- PRUEBAS DE ALERGIA**

### **5.3.1.- HISTORIA CLÍNICA**

#### **Anamnesis**

Del cuestionario de preguntas generales que los padres de los niños completaron al diagnóstico, se han obtenido los resultados que se expresaban en las Tablas correspondientes del apartado de resultados (Tablas 7-12).

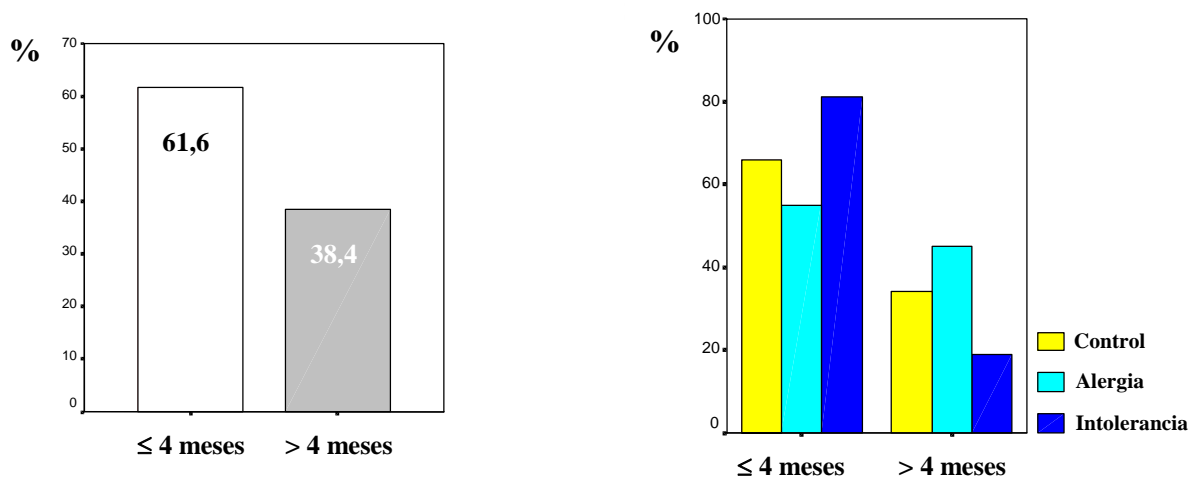
#### **Antecedentes personales**

Dentro de los antecedentes personales, y en relación con las características de la lactancia materna, no se han detectado diferencias entre controles, alérgicos e intolerantes en el tiempo de duración de la lactancia exclusiva que se encuentra entre los 3 y los 4 meses de duración (Tabla 7). Como se puede observar en el siguientes diagramas de barras hasta un 61,5% de la población estudiada recibe lactancia materna exclusiva por un tiempo menor o igual a 4 meses. Además, son los niños intolerantes los que con más frecuencia reciben únicamente lactancia exclusiva hasta los 4 meses (Diagrama 1).

La duración de la lactancia exclusiva es de una media de 4 meses para los 3 grupos, por lo que no se observan diferencias entre ellos (Tabla 7). En la tabla se indican los porcentajes de niños que reciben lactancia materna de forma exclusiva hasta los 4 meses de edad o, por un tiempo superior a los 4 meses. Es decir, la duración de la lactancia exclusiva no influye en la edad en la que aparecen los síntomas de la alergia/intolerancia. Este resultado ha sido también indicado por Björkstén y col. (1995).

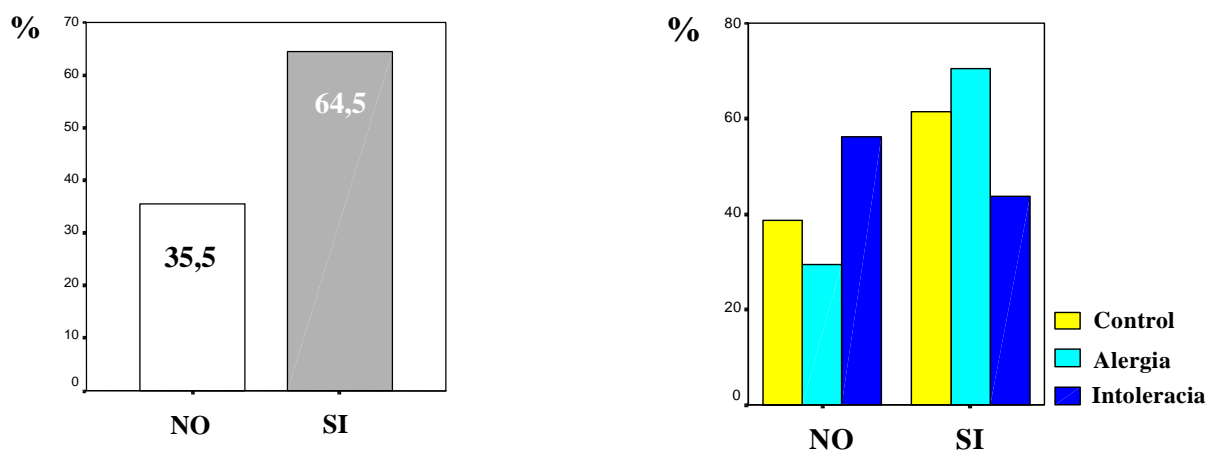
**DIAGRAMA 1**

**LACTANCIA MATERNA. PORCENTAJE DE NIÑOS CON LACTANCIA EXCLUSIVA POR UN TIEMPO DE HASTA 4 O SUPERIOR A 4 MESES.**



**DIAGRAMA 2**

**BIBERÓN PIRATA. PORCENTAJE DE NIÑOS QUE TOMAN BIBERÓN EN TRANSICIÓN.**





Por otra parte, la administración de biberón pirata, biberón que reciben en el hospital en las primeras 24 horas de vida, es independiente de que los niños sigan con lactancia materna exclusiva o no. Se trata de un biberón en transición, pero no deja de ser un primer contacto con proteínas de leche de vaca, extrañas para el niño. Como se puede observar en los diagramas de barras anteriores (Diagrama 2), hasta un 64,5% del total de la población estudiada recibieron biberón en transición. El porcentaje de niños alérgicos que recibe biberón en el hospital (biberón pirata) como se observa en la Tabla 5 es de un 70,5%. La cifra aunque elevada, también lo es para niños intolerantes y controles: 43,8 y 61,4 %, respectivamente. En un estudio llevado a cabo por Sanz Ortega y col. (2001) el porcentaje de niños alérgicos que reciben fórmula infantil es mucho menor, de un 33%. Esta enorme diferencia puede deberse al pequeño tamaño de muestra que estos autores consideran (n = 6).

Como se puede observar en la Tabla 8, tampoco se presentan diferencias al comparar pacientes con los controles en cuanto al porcentaje de niños que reciben biberón pirata, ni en cuanto a la lactancia exclusiva.

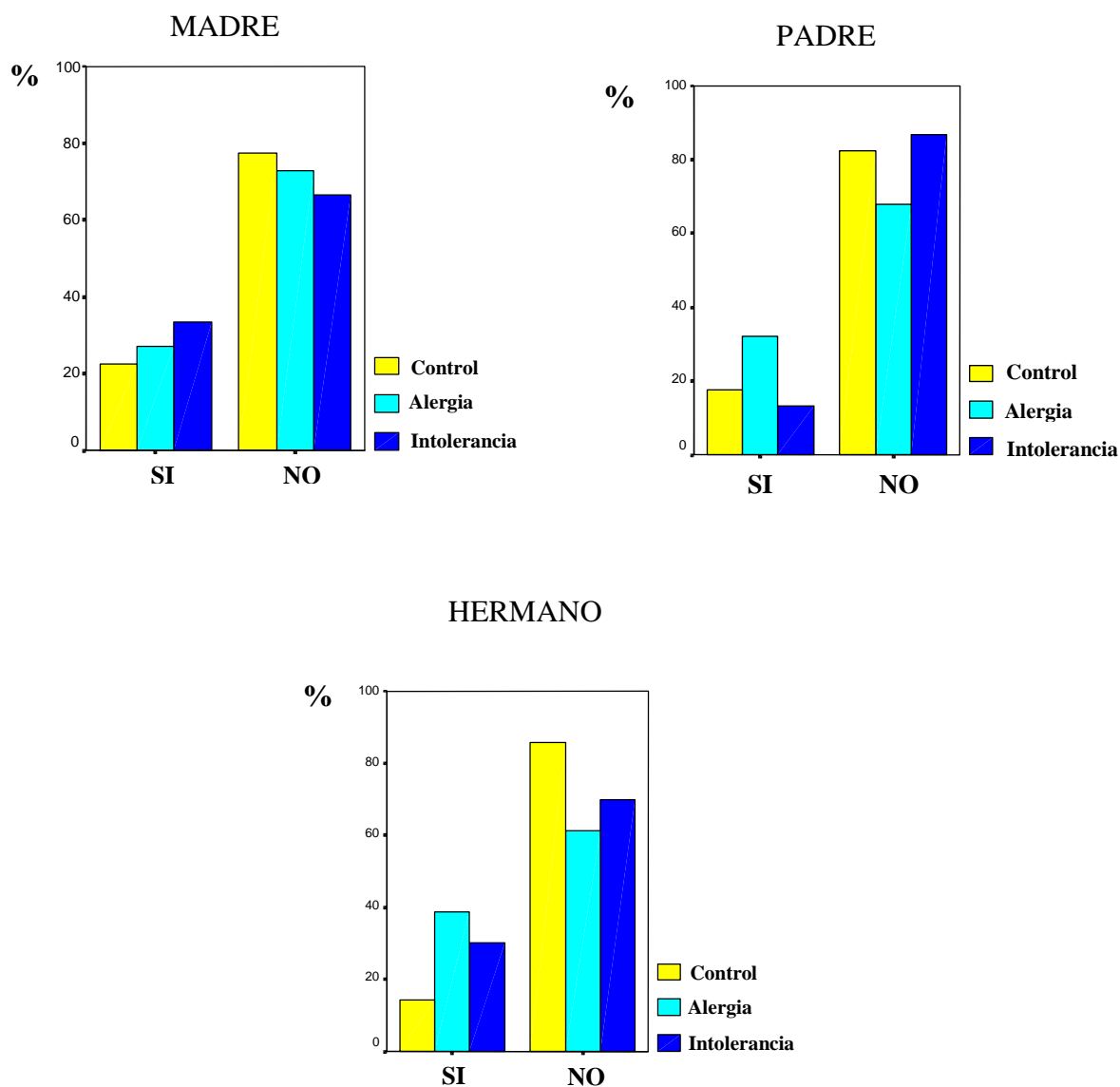
En relación con la reacción que tiene lugar tras la introducción de la primera fórmula infantil (leche de vaca) no se observan diferencias ni en el tiempo de aparición de los síntomas ni en el tipo de síntomas que presentan los 3 grupos de niños (Tabla 9). La mayor parte de los niños, independientemente del grupo, presentan síntomas cutáneos de tipo inmediato tras la introducción de la fórmula infantil. En otros estudios también se observan estos resultados en relación con los niños alérgicos (Sanz Ortega, 2001).

### **Antecedentes familiares**

Como se puede observar en la Tabla 10 y en los diagramas 3 correspondientes a antecedentes atópicos, un alto porcentaje de niños dentro de cada grupo, no presenta antecedentes familiares atópicos. Sin embargo, es de destacar el hecho de que dentro de los niños con madre atópica el porcentaje mayor corresponde a los intolerantes mientras que el porcentaje mayor de niños con padre o hermano atópico se observa en los niños alérgicos.

**DIAGRAMA 3**

PORCENTAJE DE NIÑOS CON ANTECEDENTES ATÓPICOS.



Resultados similares se han observados en el seguimiento de 64 recién nacidos: 46 con historial familiar de atopia y 21 sin historial familiar de atopia, durante los primeros 18 meses de vida con el fin de relacionarlos con la aparición de enfermedad atópica (Björkstén y col., 1995).

Por otra parte, el porcentaje de hermanos alérgicos que presentan los niños con alergia es muy superior al de los controles (38,7% frente 14,3%). Sin embargo, de los 36 hermanos que tienen los niños del estudio (de muchos niños no tenemos información al respecto): 20 son del grupo de niños con alergia (es decir un 55,6%), 9 de los controles (25%) y 7 de los intolerantes (19,4%). Debido a esta desproporción aunque los porcentajes de niños con hermanos alérgicos son distintos, no existe una dependencia significativa.

Dentro de los niños con familiar atópico, en la tabla 10 se especifica además, el porcentaje de niños con padres que presentan alergia a alimentos u otro tipo de enfermedad atópica. Como puede observarse, en los 3 grupos de niños y tanto para la madre como para el padre, éstos presentan en su mayoría otras enfermedades alérgicas distintas a la alergia alimentaria.

Al analizar en su conjunto al grupo de pacientes y compararlo frente al grupo control, tampoco se observan diferencias en cuanto a los antecedentes familiares de primer grado (Tabla 11).

En un estudio reciente en el que se lleva a cabo un análisis detallado de los familiares más cercanos (primera y segunda generación) de un grupo de 180 niños alérgicos, se pone de manifiesto que hasta un 91% de los niños presenta un familiar atópico. Al considerar únicamente, y como en nuestro estudio, los familiares más cercanos (padres y hermanos) se indica que en un 55,5, un 36 y un 55% de los niños alérgicos, su madre, padre o hermanos, respectivamente, presentan enfermedad atópica o intolerancia alimentaria. Estos porcentajes son superiores a los que presentamos, lo que podría ser debido a que los autores también incluyen en estos porcentajes a los familiares con intolerancia alimentaria (Korol y Kaczmariski, 2001).

En un estudio prospectivo en el que se siguieron 1663 recién nacidos durante el primer año de vida, el 83% de los niños con alergia presentaba antecedentes familiares de primer grado de enfermedad atópica frente al 19% del grupo no alérgico. Hay que tener en cuenta en este estudio, por un lado el pequeño tamaño del grupo de niños con alergia: 6 de 56 niños con sospecha, y del total de niños del estudio (n=1657). Además, el grupo control de este estudio prospectivo está constituido por niños sanos, mientras que en el que aquí se

presenta, aunque se trata de niños sanos, han sido diagnosticados con sospecha de alergia/intolerancia por sufrir reacción adversa a proteínas lácteas, en algunos casos no objetivada en el momento del estudio. Esto podría explicar la gran diferencia en los porcentajes de niños con antecedentes familiares de primer grado en ambos estudios. En este sentido es interesante observar del estudio anterior, el hecho de que de los 308 recién nacidos que presentaban un antecedente familiar de primer grado de enfermedad atópica, cuatro de ellos presentaron posteriormente alergia a las proteínas de la leche de vaca (1,3%), mientras que de los 26 recién nacidos con dos antecedentes familiares de primer grado de enfermedad atópica, uno de ellos desarrolló un cuadro de alergia a PLV (3,8%) (Sanz Ortega y col., 2001).

En otro estudio de seguimiento durante 3 años de niños con alergia o intolerancia a las proteínas de la leche (edad media 4 meses), se observan diferencias en cuanto a los antecedentes familiares de atopia. Los niños en los que persiste la intolerancia después de 3 años, son los que presentan, con mayor frecuencia algún familiar de primer grado con atopia (80%) que los niños que desarrollan tolerancia (20%). En este estudio consideran con enfermedad atópica todos los familiares que presentan asma bronquial, rinitis, dermatitis o conjuntivitis y con resultados positivos al test cutáneo tipo *prick* y/o RAST a alimentos ó a aeroalergenos (Carrocio y col., 2000).

### **5.3.2.- PRUEBAS DE PROVOCACIÓN ORAL CON EL ALERGENO SOSPECHOSO**

Como se ha indicado en el apartado de Sujetos y Métodos, a partir de las pruebas de provocación oral con el alimento sospechoso (leche adaptada) causante de la reacción adversa, se establece lo más importante del diagnóstico: si el niño puede o no seguir tomando proteínas de leche de vaca, y por tanto, en función del resultado, la inclusión en uno u otro grupo del estudio. Por ello, todos los niños que han dado negativo en estas pruebas serán incluidos dentro del grupo control.

Los niños con pruebas de provocación oral positivas, serán incluidos dentro del grupo de pacientes, y en función de los resultados a otras pruebas diagnósticas inmunes, serán diagnosticados como alérgicos o como intolerantes a las proteínas de la leche de

vaca. En este sentido, se puede ver que un 31,65% (44/139) de los niños con sospecha de alergia no presentan reacción ante la provocación oral, un 56,83% (79/139) son alérgicos y un 11,5% (16/139) son intolerantes. La proporción de niños con alergia es superior a la de intolerantes.

Niggemann y col. (2001) muestran porcentajes de 89% alérgicos y un 10,8% de intolerantes en 139 niños con sospecha de alergia a distintos alimentos (leche, huevo, etc.) y de 2 meses a 12 años (mediana 13 meses). Si se considera únicamente a aquellos con sospecha de reacción a la leche de vaca (n=52), los porcentajes son de 88% de niños con reacción tipo IgE y un 11,53% de ellos también con provocación oral positiva pero sin mecanismo IgE demostrable. Todos los niños presentaban DA al diagnóstico; esto puede ser la causa del mayor porcentaje de niños alérgicos que indican estos autores al compararlo con el estudio que aquí se presenta.

Los resultados sobre las características de las pruebas de provocación oral en los pacientes, se presentan en la tabla 10. Como puede observarse, los pacientes alérgicos presentan con más frecuencia reacción de tipo inmediata tras la provocación oral, que los pacientes intolerantes, 87% y 41%, respectivamente.

Además, dentro de los niños alérgicos, un 87,3% presenta reacción inmediata frente al 12,7% con síntomas de tipo retardado. De igual forma, Plaza Martín y col. (2001) en un estudio en niños de hasta 6 meses con sospecha de alergia a las proteínas de la leche, un 92% de ellos presenta reacción inmediata y tan sólo un 6%, retardada (n=49). Se diagnosticaron de padecer hipersensibilidad inmediata a las proteínas de la leche todos estos niños que presentaban provocación positiva inmediata (hasta 2 horas) y respuesta al *prick* test positiva frente a un alérgeno, al menos, junto con valores de IgE específica positivas.

Al fijarnos en el tipo de síntomas que presentan los pacientes en las pruebas de provocación oral, se detecta que el 92% de los niños alérgicos presentan una reacción de tipo cutánea, mientras que sólo un 58% de los intolerantes muestran este tipo de reacción (Tabla 10). En cuanto al tipo de reacción cutánea, local o generalizada, la mayor parte de

los pacientes presentan reacción de tipo local; no observándose diferencias significativas entre alérgicos e intolerantes.

Estos resultados coinciden con los presentados por otros autores en relación al tiempo de aparición de los síntomas tras la provocación oral con el alérgeno sospechoso: reacción de tipo inmediato y carácter cutáneo que con mayor proporción presentan los niños alérgicos (Sanz Ortega y col., 2001). En un estudio retrospectivo en el que se seleccionan 98 historias clínicas de niños con criterios diagnósticos de reacción adversa a alimentos, 35 son alérgicos por presentar IgE específica y/o *prick* test cutáneo positivo y 63 niños fueron diagnosticados de intolerancia en base a sospecha clínica ratificada por prueba de exclusión favorable. El alimento más comúnmente implicado fue la leche de vaca (91% de los casos) seguido del huevo, la soja y el pescado. Al igual que en el presente estudio, los pacientes alérgicos presentan con más frecuencia reacciones inmediatas ante la provocación oral que los intolerantes. La reacción inmediata se da en un 77% de los alérgicos mientras que en los intolerantes tan sólo aparece en un 5%. Además, las principales manifestaciones de los pacientes siguen el mismo patrón que en el presente estudio. Un 68% y un 48% de los alérgicos presentan reacciones cutáneas y gastrointestinales, respectivamente. Por el contrario, los intolerantes son más propensos a padecer reacciones gastrointestinales (65%) y en segunda lugar, las cutáneas (44%). En otro estudio en niños alérgicos, también se encuentran con mayor frecuencia los síntomas cutáneos, hasta un 68% frente al 12,5% que suponen los digestivos y un 1,3% los de tipo respiratorio. Dentro de las reacciones cutáneas un 12,5% fue de tipo local y un 56% de los casos reacción generalizada (Lebrero y col., 2001).

Sin embargo, pocos estudios en la literatura comparan los síntomas entre alergia e intolerancia a las proteínas de la leche de vaca.

## **PRUEBAS INMUNOLÓGICAS**

Como ya se ha explicado en el apartado de Sujetos y Métodos, en el diagnóstico de alergia/intolerancia a las proteínas de la leche y, con el fin de establecer el mecanismo inmunológico como base de la reacción adversa, se tienen en cuenta los resultados de los estudios inmunológicos.

En este sentido, se diagnostican como alérgicos aquellos niños que presentan pruebas de provocación oral positiva, y además, *prick* cutáneo y/o IgE específica positivas. Por el contrario, se consideran como intolerantes a las proteínas de la leche, aquellos niños que presentan provocación oral positiva pero con pruebas cutáneas e IgE específicas negativas, es decir, con ausencia de mecanismo inmunológico conocido.

### 5.3.3.- PRUEBAS CUTÁNEAS TIPO “PRICK”

En relación con las pruebas cutáneas tipo *prick*, y como es de esperar por tratarse de uno de los criterios diagnósticos, se observan diferencias significativas entre los controles, alérgicos e intolerantes, tanto para la leche de vaca, como para las proteínas lácteas: ALA, BLG y CAS, y para la fórmula adaptada. En todos los casos, los niños alérgicos presentan una mayor respuesta que los controles y que los intolerantes, entre los que no se observan diferencias significativas (Tabla 13).

Algunos autores han indicado que los niños con intolerancia presentan con mayor frecuencia reacciones de tipo retardado y por ello, respuesta positiva al test cutáneo tipo *patch* por su buen valor predictivo positivo para reacciones de tipo retardado (Nieggemann y col., 2000; Roehr y col., 2001). Sin embargo, en nuestro estudio no se llevó a cabo este tipo de test cutáneo por no formar parte de las pruebas del protocolo diagnóstico de alergia/intolerancia del Hospital.

En la tabla 14 se muestran los porcentajes de niños de cada grupo que presentan sensibilización (respuesta positiva) frente a las distintas proteínas alergénicas. Para ello, previamente se han realizado tablas de contingencia de 2 factores. Un primer factor de estas tablas lo constituye en cada caso, el resultado positivo o negativo frente a cada uno de los alérgenos utilizados en las pruebas cutáneas (leche de vaca, ALA, BLG, CAS y fórmula infantil), y como segundo factor para todas las tablas, el factor grupo, de niños: controles, alérgicos e intolerantes. En la tabla que presentamos se muestran solamente las respuestas positivas al test para cada alérgeno y para cada grupo. Esta tabla se obtiene a partir de cada una de las anteriores tablas de contingencia, donde se observa una dependencia entre los grupos de niños y la respuesta al test; es decir, el tipo de respuesta

positiva o negativa está influenciado por el hecho de que los niños tengan diagnóstico de alérgicos, intolerantes o bien, se descarte la presencia de enfermedad.

Dentro de los niños del grupo control del presente estudio, se puede observar que hay un pequeño número de respuestas positivas al test cutáneo ( $n=7$ ). No obstante, al revisar los datos se comprobó que únicamente 3 niños (6,8%) son los responsables de estas respuestas positivas al test cutáneo frente a varios de los alérgenos utilizados. Estos 3 niños son los responsables de las 7 respuestas positivas al test para los distintos alérgenos. En cuanto a las pruebas *prick* con fórmula adaptada (*prick by prick*), hay 5 niños controles (11,36%) que presentan reacción cutánea positiva a la misma (Tabla 14).

Por otra parte, y con el fin de determinar la alergenidad de las distintas fracciones proteicas, se ha estudiado la fracción que con más frecuencia es responsable de sensibilización en cada uno de los grupos de estudio del presente trabajo. Es decir, se ha comparado la respuesta en cada grupo de niños frente a los diferentes alérgenos de la prueba. Así, en los niños alérgicos, al comparar las respuestas de los distintos alérgenos, se observan diferencias significativas entre todos los alérgenos utilizados. La respuesta frente a la leche de vaca es significativamente mayor que para el resto de sus proteínas alérgicas excepto para la ALA. Además, al comparar los distintos alérgenos de la leche entre sí, se observa entre los niños alérgicos mayor respuesta a la ALA y BLG que para la CAS. En ningún caso se compara la respuesta a la leche o sus alérgenos con la respuesta cutánea a la fórmula adaptada ya que, a diferencia de los primeros, en ésta última, se considera positivo la presencia de reacción cutánea.

Se ha observado distinta capacidad de respuesta a las pruebas cutáneas en niños de menor edad. Por tanto, los *tests* de detección de estos parámetros en niños muy pequeños no serían una medida útil en la valoración de estos parámetros según Martín Esteban y col. (1999). En este sentido, en el presente estudio se han analizado algunos parámetros para los distintos intervalos de edad dentro de cada grupo de niños.

Así, se ha comparado la respuesta al test cutáneo en los intervalos de edad previamente establecidos. Únicamente en niños alérgicos y en respuesta a ALA, se observan diferencias para los distintos grupos de edad; siendo el porcentaje de respuestas



positivas más alto en el grupo de niños más mayores (Tabla 15). En la respuesta cutánea a la fórmula infantil (*prick by prick*) se puede concluir que las diferencias en los meses de edad no influyen en la respuesta al test cutáneo.

En un estudio reciente de niños con lesiones cutáneas de tipo alérgico o con infecciones recurrentes de 5-37 meses (mediana 25 meses) no se han observado diferencias significativas en la respuesta al test *prick* en alérgenos alimentarios pero sí frente a inhalados, con tan sólo un 5% de respuesta en niños menores de 12 meses frente al 19,5% y 25% de niños de hasta 2 y 3 años, respectivamente (Malivnowska y col., 2002). Además, cuando comparan los resultados en función de la edad, solo establecen 3 intervalos de edades, en el primero de ellos, hasta los 12 meses, se incluirían todos nuestros niños del estudio. Por todo ello, los resultados no se pueden, sin embargo, comparar con los del estudio que aquí se presenta, donde hay que considerar que, solamente un 10% de los niños son menores de 12 meses.

#### **5.3.4.- DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINA E TOTAL EN SUERO**

Con relación a la IgE sérica total existen diferencias significativas entre controles, alérgicos e intolerantes correspondiendo los valores medios más altos al grupo de pacientes alérgicos, seguido de los controles y los valores más bajos a los intolerantes. Es interesante resaltar que a pesar de estas diferencias, el grupo de niños alérgicos no presenta, como sería de esperar, valores mucho más elevados que los otros 2 grupos. Por ello, y debido a la alta dispersión de los datos, como puede verse al analizar los valores de los rangos intercuartiles, al comparar los grupos 2 a 2, las diferencias sólo son significativas entre controles y alérgicos (Tabla 16). Al comparar por pares, aplicando pruebas más sensibles para comparar los resultados entre alérgicos e intolerantes, sí se observan diferencias en los valores de IgE total entre ambos grupos. Niggemann y col. (2001) tampoco observan diferencias entre niños (mediana 13 meses) con sensibilización IgE y, niños aparentemente no sensibilizados, ambos con provocación oral positiva. Esta falta de diferencias se debe, según los autores, a la alta dispersión de los niveles séricos de IgE (2-11325 kU/l frente a 15-796 kU/l).

Como es de esperar, únicamente en los niños con alergia se observa que la IgE sérica total se correlaciona positivamente con los valores de IgE específica frente a leche y a sus principales proteínas alergénicas: CAP Leche ( $\rho = 0,698$ ;  $p < 0,05$ ), CAP BLG ( $\rho = 0,548$ ;  $p < 0,05$ ); CAP caseína ( $\rho = 0,616$ ;  $p < 0,05$ ).

Al comparar el grupo de pacientes (niños alérgicos e intolerantes) frente a los controles también se observan diferencias significativas, siendo los valores de IgE superiores en los pacientes (Tabla 17).

Al igual que en las pruebas cutáneas, los niveles de IgE sérica total se han comparado para los distintos intervalos de edad. Así, y considerando como valores de referencia los descritos por el laboratorio fabricante que se presentan en la Tabla 18; para niños de hasta 12 meses niveles normales serían los inferiores a 30 UI/ml. En la tabla 19 se muestra el porcentaje de niños de cada grupo con valores inferiores o superiores a este valor dado de referencia. Como se observa en dicha tabla, únicamente en el grupo de niños alérgicos se observaron diferencias significativas en función de la edad. Los niños más pequeños presentaron con más frecuencia niveles de IgE inferiores a 30 UI/ml. Estos porcentajes fueron aumentando con la edad. Así, de entre 9-12 meses hasta un 64,7% de ellos mostraron  $IgE \geq 30$  UI/ml frente al 23% de los más pequeños (0-4 meses) que presentaron estos valores de IgE total. Por otro lado, es interesante observar niveles superiores a los normales de referencia dentro del grupo de niños sanos. Un 10% de los niños del grupo control tenían valores de IgE total superiores a los valores de referencia. Esta falta de correlación entre los valores en suero de IgE total y la presencia de alergia alimentaria ha sido ya descrita anteriormente (Gordon y col., 1982).

En este mismo sentido, numerosos autores postulan que la determinación de IgE total en suero presenta un valor limitado en el diagnóstico de alergias debido al alto número de resultados elevados que no se correlacionan con la sintomatología clínica. Además, los valores normales de IgE total no siempre excluyen la presencia de enfermedad alérgica (Saarinen y col., 1982; Bock y Sampson, 1994).

### 5.3.5.- DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINA E ESPECÍFICA EN SUERO

Como ocurre con los resultados de las pruebas *prick* cutáneas, la determinación de IgE específica constituye un criterio diagnóstico. Por ello, y como es de esperar, hay diferencias significativas entre alérgicos, intolerantes y controles en relación a los valores de IgE específica frente a la leche de vaca, la ALA, BLG y CAS, tanto en concentración (Tabla 20) como en clase (Tabla 21). Además, los niños alérgicos presentan siempre valores significativamente más elevados que los controles y que los intolerantes.

Parece interesante mostrar el grado de alergenicidad de las distintas fracciones proteicas de la leche de vaca en relación a los resultados de IgE específica. De igual forma que para las pruebas cutáneas, se realizan previamente tablas de contingencia de 2 factores. Uno de los factores de la tabla está constituido, por los resultados (positivo o negativo) de presencia de anticuerpo IgE específico frente a cada uno de los antígenos (leche de vaca, ALA, BLG, caseína). El otro factor y para todas las tablas, es el factor grupo: controles, alérgicos e intolerantes. En la tabla 22 se presentan únicamente los porcentajes de respuesta positiva obtenidos en las tablas de contingencia anteriores y correspondientes a cada antígeno y para cada grupo. Se observa una dependencia entre el factor grupo de niños y la presencia de anticuerpos específicos frente a la IgE.

Así, algunos estudios constatan una mayor frecuencia de sensibilización a BLG seguido de ALA y después de CAS (Goldman y col., 1963; Martín Esteban, 1993). Otros en cambio, encuentran una mayor incidencia de IgE específica frente a la leche, seguido de BLG, ALA y por último de CAS (Andres de Llano y col., 1997).

Estas diferencias entre los resultados de los estudios se pueden atribuir a la distinta purificación de los alérgenos utilizados, criterios diagnósticos, etc. Lo que sí es común en los distintos estudios es la sensibilización simultánea en un mismo paciente a varias proteínas vacunas.

Como se puede observar, algunos niños del grupo control también presentaron respuesta de anticuerpos IgE frente a la leche de vaca y sus alérgenos. En concreto, se mostraron 16 respuestas positivas en la detección de anticuerpos IgE específica frente a

alguno de éstos (Tabla 22). Sin embargo, estas respuestas positivas son debidas únicamente a 8 niños.

Considerando las pruebas tanto *in vivo* como *in vitro* para la determinación de anticuerpos IgE específicos, se observa que en el grupo control, hay 11 niños que mostraron respuesta positiva de anticuerpos IgE frente a algunos de los alérgenos utilizados en las pruebas (*prick* o CAP). Esta positividad se presenta, bien en el test cutáneo frente al menos uno de los 4 alérgenos utilizados ( $n=3$ ; 6,81%) o bien, en las pruebas inmunes de determinación de anticuerpos IgE específicos (CAP), frente al menos 1 alérgeno ( $n=8$ ; 18%). Sólo un niño del grupo control presentó IgE específica frente a todos los alérgenos.

En el grupo de niños alérgicos se correlacionan los resultados de IgE específica a los distintos alérgenos. Así, la leche de vaca se correlaciona con las proteínas: ALA ( $\rho=0,633$ ;  $p<0,05$ ); BLG ( $\rho=0,569$ ;  $p<0,05$ ); caseína ( $\rho=0,925$ ;  $p<0,05$ ) Además, es interesante observar la correlación positiva en los alérgicos entre las pruebas de determinación de IgE *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, *prick* leche: CAP leche ( $\rho=0,358$ ;  $p=0,003$ ); CAP ALA ( $\rho=0,277$ ;  $p=0,021$ ); CAP caseína ( $\rho=0,410$ ;  $p=0,001$ ).

Por otra parte, al comparar los niveles de anticuerpos IgE específicos en función de los intervalos de edad establecidos, sólo los niveles de IgE frente a leche de vaca parecen estar influenciados por la edad en los niños alérgicos. Los niños más pequeños, de entre 0 y 4 meses presentaron valores más bajos de este anticuerpo que los niños más mayores (Tabla 23).

### **5.3.6.- DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINA G FRENTE A LECHE DE VACA (IgG)**

En cuanto a los valores de IgG séricos frente a leche de vaca no se observan diferencias significativas entre controles, alérgicos e intolerantes (Tabla 24). Del mismo modo, Host y col. (1992) han encontrado resultados similares en 39 niños con alergia a la

leche midiendo los niveles de IgG en distintos puntos: en el nacimiento, en el diagnóstico y a los 12 meses y, comparando con 33 controles sanos.

En el presente estudio, al considerar a los pacientes como un grupo, sí se observan diferencias en los niveles de IgG al comparar con los controles, que presentan valores inferiores (Tabla 25). Por tanto, estos niveles más elevados en los pacientes se asocian con el estado de alergia/intolerancia a las proteínas de la leche de vaca. Por el contrario, en otros estudios son los niveles elevados de anticuerpos IgG frente aeroalergenos, pero no frente a alimentos, los que se asocian con un menor desarrollo de atopía en niños (Jenmalm y Björkstén, 2000).

Duchateau y col. (1998) encuentran valores superiores de IgG frente a BLG en niños alérgicos/intolerantes que en controles sanos, en el momento de mayor presencia de síntomas e independientemente de los valores de IgE específica. La IgG frente a BLG se analiza también en un subgrupo de 14 niños tras dieta de exclusión de leche y por tanto, asintomáticos. En este subgrupo de niños, tras reprovocación, 8 seguían aun sintomáticos y los 6 restantes habían desarrollado tolerancia. Es interesante observar la disminución de los niveles de IgG que tiene lugar en ambos grupos de niños: de 837 a 99 AU y de 628 a 71 AU, en alérgicos y en tolerantes, respectivamente. Esto no se muestra en los sujetos sanos en que los bajos niveles de IgG son independientes del consumo de leche. Así, los autores explican la relación que tiene lugar en los pacientes entre los niveles de IgG y la exposición al alérgeno y por tanto, su poder indicador de una dieta de exclusión eficiente.

Hay que tener en cuenta que Duchateau y col. (1998) establecen el diagnóstico de alergia en función de la historia clínica, de la eficacia de la dieta de exclusión y, mediante confirmación con la prueba de provocación oral positiva a la leche de vaca. Es decir, verifican que se produce una reacción adversa tras la ingesta del alimento sospechoso pero no tienen en cuenta el posible mecanismo inmunológico como base biológica de la reacción adversa. Por ello, el grupo de pacientes que estos autores estudian podría corresponderse con el grupo de niños alérgicos y de intolerantes del estudio que aquí se presenta y, siendo por tanto, los resultados de ambos estudios, comparables.

Sin embargo, al comparar los puntos de toma de muestras, los pacientes del presente estudio se corresponderían con el subgrupo de pacientes analizados también en un segundo punto, ya que tiene lugar justo antes de la prueba de provocación y por tanto, tras 1 mes de exclusión del alérgeno. Esto podría explicar la falta de mayores diferencias entre los controles sanos y los alérgicos/intolerantes. Después del periodo de eliminación de la leche de la dieta, los niveles de IgG disminuyen aproximándose más a los valores de los niños sanos.

Además, en el estudio llevado a cabo por Duchateau y col. (1998) se da un patrón común de especificidad de los anticuerpos IgG anti-BLG en los pacientes alérgicos, no presente en los asintomáticos sanos o en los que han desarrollado tolerancia. Esta marcada selectividad está dirigida, en concreto, hacia epítomos conformacionales *vs* estructurales. Los autores analizan esta capacidad en proteína intacta y en productos tras digestión péptica incompleta. Los resultados muestran que en los alérgicos la mayor parte de sus anticuerpos IgG se dirigen hacia epítomos de la proteína nativa que son destruidos tras digestión péptica. Esta selectividad parece ser independiente del título de anticuerpos, relacionado con el nivel de exposición al alérgeno, por lo que estos niveles de anticuerpos disminuyen rápidamente en pocas semanas tras dietas de exclusión. En este estudio observan además que la mayor parte de los pacientes con síntomas atópicos no presentaban niveles detectables de IgE específica. Los autores concluyen que aunque los niveles de IgG no se consideran implicados en el desarrollo de la sintomatología, su relación directa con la dieta de eliminación, explicaría su posible utilización como marcador de manipulación dietética.

Por otra parte, es interesante resaltar las diferencias encontradas en el estudio que aquí se presenta, para el grupo de niños sanos, en cuanto a los niveles de IgG con relación a los intervalos de edad propuestos. Como se puede observar en la Tabla 26 los niños más pequeños presentan valores aumentados, que van disminuyendo con la edad. Otros autores también hacen referencia a las variaciones en los niveles de IgE frente a la leche y frente al huevo que tienen lugar con la edad (Eysink y col., 2002). En concreto, en distintos estudios se observa la disminución que tiene lugar en los niveles de IgG frente a la leche a partir de los 6 meses y frente al huevo a partir de los 3 años en que se alcanzan los valores máximos (Jenmalm y Björkstén, 1999). Este resultado coincide por tanto, con el presente estudio

siendo esta disminución de los niveles de IgG probablemente debida a la falta de exposición con el alérgeno.

Los valores de IgG y de IgE no se correlacionan en la población del presente estudio. Tampoco Duchateau y col. (1998) observan esta correlación. Del mismo modo, Host y col. (1992) no observan correlación entre los niveles de IgE total y de IgG en 39 niños con alergia/intolerancia a las proteínas de la leche, al nacimiento ni en medidas posteriores, independientemente de que la reacción sea mediada o no por IgE, es decir, tanto para alérgicos como para intolerantes. En otros estudios sí se comprueba una relación entre los valores de IgE y de IgG en suero. Niños con valores elevados de IgG frente a distintos alimentos acaban desarrollando respuesta de tipo IgE frente a aeroalérgenos (Calkhoven y col., 1991). Berrens y Homedes (1991) observan esta correlación en pacientes alérgicos con reacción de tipo inmediata tanto para aeroalérgenos como para alimentos.

Pocos estudios han analizado la regulación de la respuesta de anticuerpos IgG por medio de citoquinas segregadas de forma específica frente a un antígeno. La relación entre inmunidad celular Th1 y la producción de anticuerpos no ha sido demostrada aún en humanos. Jenmalm y col., 1999 observan que los síntomas atópicos están asociados con niveles elevados de IgG, especialmente de IgG4, frente al polen de abedul y a la BLG. El objetivo del estudio fue investigar la posible relación entre los síntomas atópicos, la producción de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica tras estimulación con abedul o con BLG, y los valores en suero de IgE y de subclases de IgG específicas frente a estos alérgenos. 55 niños de 8 años fueron seguidos de forma prospectiva desde el nacimiento. Se midió la producción *in vitro* de citoquinas IL-5, IL-6, IL-10 por ELISA y de IL-4 e IL-9 por RT-PCR. La expresión de IL-4 y producción de IL-6 se correlacionaba con IgG4 también frente a abedul; mientras que se encontró una correlación positiva entre el IFN- $\gamma$  y la IgG1. Sin embargo, no se observa correlación alguna entre la producción de citoquinas tras estimulación con BLG y los niveles de IgG frente a BLG, a excepción de una correlación negativa entre la IL-4 y la IgG1.

Sería interesante en nuestro estudio, correlacionar los niveles de IgG frente a la leche en el momento del diagnóstico en relación a la distinta evolución de los pacientes.

Sin embargo, como ya se indicó anteriormente, debido al pequeño tamaño de la muestra de niños que desarrollan tolerancia, no se ha llevado a cabo tratamiento estadístico al respecto. Así, en el caso de tener significación estadística estos valores de concentración podrían ser utilizados como predictivos del mantenimiento de la alergia/intolerancia o desarrollo de tolerancia. En este sentido, James y col. (1992) tratan de determinar si la respuesta específica frente a la leche se correlaciona con el desarrollo de tolerancia en 29 niños alérgicos de una media de edad al diagnóstico de 3 años. Para ello, analizan las concentraciones de IgE, IgG, IgG1 y IgG4 en distintos intervalos de tiempo. En los niños que desarrollan tolerancia las concentraciones de IgE específica y el cociente IgE/IgG frente a ambas proteínas es inferior al diagnóstico que en los niños que mantienen la alergia y además, va disminuyendo significativamente con el tiempo. En otro estudio, Eysink y col. (2002) observan en 397 niños de 1 a 4 años (media 28 meses) y sin riesgo de desarrollar alergia, que en concreto, los niveles de IgG frente a trigo y arroz y frente a la naranja pudieran ser útiles como tests para detectar de forma precoz niños de mayor riesgo de sensibilización IgE en un futuro. Sin embargo, estos autores atribuyen a la IgG para alimentos en general, un valor predictivo positivo de un 16,5% y negativo de un 90,6% no resultando por tanto, útil en la práctica clínica para la identificación a nivel individual de niños con riesgo alérgico.

El papel de los anticuerpos IgG en las alergias sigue sin estar del todo claro. Por ejemplo, no está establecido si el aumento de IgG específica observado durante la inmunoterapia es causante de la falta de síntomas o si únicamente es consecuencia del fenómeno de alta exposición al antígeno al que hacen referencia distintos autores (Boluda y col., 1997; Keller y col., 1999).

A pesar de no estar clara la implicación de la IgG en el desarrollo de la sintomatología, estos anticuerpos representan un posible marcador de la respuesta inmune frente a los principales alérgenos alimentarios a los que nos vemos expuestos a lo largo de toda la vida.

#### **5.4.- PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS**



### **5.4.1.- SERIE ERITROCITARIA**

Dentro de los parámetros hematológicos, y en concreto, en relación con la serie roja, solo en los valores correspondientes a la hemoglobina corpuscular media (HCM) y al volumen corpuscular medio (VCM) se observan diferencias entre controles, alérgicos e intolerantes, siendo estos valores significativamente menores en alérgicos que en intolerantes y en controles (Tabla 27). Sin embargo, los niveles en alérgicos se encuentran para todos los grupos dentro de los valores de referencia correspondientes a la edad (Tabla 28).

Al considerar a los alérgicos e intolerantes como un único grupo, tampoco se observan diferencias entre este grupo de pacientes (alérgicos e intolerantes) y los controles sanos (Tabla 29).

Existen pocas referencias bibliográficas en las que se ven reflejados estudios sobre los parámetros hematológicos en estos grupos concretos de población infantil con alergia a la leche de vaca. En uno de ellos se valora el estado nutricional de niños de una media de edad de 2 años con alergia a las proteínas de leche de vaca. La cantidad de fórmula infantil y de proteína que tomaban los niños alérgicos era menor que en los niños sanos (Tianinen y col., 1995). En otro estudio se evalúa el estado nutricional de 19 niños mediante un seguimiento durante la dieta de exclusión (Paganus y col., 1992).

En cuanto a la presencia de anemia en niños con alergia a la leche, existen casos específicos como el de un niño con alergia a las proteínas de leche, alimentado con fórmula infantil a base de soja durante un mes. Una incorrecta preparación de la fórmula desencadenó anemia megaloblástica por deficiencia en folato (Patane y col., 1992). O el caso de 3 niños con alergia a las proteínas de la leche con síntomas gastrointestinales que presentaban anemia debida a una hemorragia intestinal oculta (Ivady y col., 1992).

Henriksen y col. (2000) evalúan la ingesta de nutrientes en niños (31-37 meses) con alergia a la leche y/o al huevo, mediante cuestionarios dietéticos; comparándola con niños sin dietas restrictivas. Observan una menor ingesta de energía, grasa, proteína y calcio en

los niños con dietas de exclusión de leche por lo que advierten de las posibles deficiencias nutricionales que pueden sufrir estos niños.

Como se puede observar, los pocos estudios encontrados en relación al estado nutricional en niños con alergias alimentarias, se refieren a niños más mayores que los del presente estudio.

#### **5.4.2.- SERIE TROMBOCÍTICA**

En cuanto al recuento de plaquetas e índices plaquetarios no se observa ninguna diferencia entre controles, alérgicos e intolerantes (Tabla 30), al igual que cuando se consideran alérgicos e intolerantes en su conjunto frente a controles (Tabla 31).

En los estudios revisados, sólo se presenta un caso de trombocitopenia en gastroenteropatía alérgica en un niño de 11 semanas (Simila y col., 1981).

#### **5.4.3.- SERIE LEUCOCITARIA**

En la serie leucocitaria no se observan diferencias entre controles, alérgicos e intolerantes, tanto en porcentaje de células (Tabla 32) como en valores absolutos (Tabla 33).

Al comparar la cantidad de eosinófilos en sangre de forma más precisa se observa que los niños alérgicos presentan niveles superiores tanto en porcentaje como en valor absoluto, frente a cada uno de los otros dos grupos estudiados (test pares de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). Además, únicamente en el grupo de alérgicos se observa una correlación entre los eosinófilos y la producción de IL-5 ( $\rho = 0,317$ ), que como ya se ha indicado anteriormente está implicada en la activación de estas células con importante función en los procesos alérgicos.

Cuando se considera el grupo de alérgicos y el de intolerantes como un único grupo (Tablas 34, 35) y compararlo frente al grupo control, se observa que el número de

neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos son superiores siempre en el grupo de pacientes pero las diferencias no llegan a ser significativas (Tabla 34).

Pocos estudios determinan el perfil y la fórmula leucocitaria en enfermedades atópicas. En individuos con asma se observa correlación entre el porcentaje de eosinófilos en esputo (Chlumsky y Pokorna, 2001) y en lavado broncoalveolar (Just y col., 2002) y la severidad de los síntomas clínicos. Los autores sugieren que este recuento pudiera ser un buen marcador del grado de inflamación de la mucosa en pacientes con asma bronquial. Además, estos resultados ponen en evidencia que la inflamación por eosinófilos que presentan los niños asmáticos está relacionada con la sensibilización alérgica (Just y col., 2002).

También adolescentes asmáticos con remisión clínica muestran niveles más elevados de eosinófilos, mastocitos, macrófagos, linfocitos T, IL-5 frente a controles. Esta inflamación subclínica pudiera determinar el riesgo de una recidiva de síntomas asmáticos más adelante. El recuento de eosinófilos en sangre se correlaciona con los niveles de estas células en tejidos (Van den Toorn y col., 2001).

En un estudio reciente por Wallaert y col. (2002) se demuestra que existe inflamación subclínica del tracto respiratorio debida a neutrófilos en los pacientes con alergia alimentaria sin síntomas respiratorios; y que la IL-8 pudiera ser mediador de esta neutrofilia. Estos parámetros se determinan en esputo de los distintos grupos de pacientes: 12 alérgicos sin asma, 8 asmáticos sin alergia y en 8 controles sanos. En los pacientes con asma se observan niveles significativamente superiores de eosinófilos; mientras que en los alérgicos el número de neutrófilos estaba aumentado frente a los otros 2 grupos. En el presente estudio ninguno de los niños estudiado presenta síntomas respiratorios al diagnóstico clínico de alergia/intolerancia a las proteínas de la leche de vaca.

## **5.5.- PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS**

### 5.5.1.- RECUENTO Y PORCENTAJE DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

Al tener en cuenta los parámetros inmunológicos, y en concreto las subpoblaciones linfocitarias, no se observan diferencias significativas comparando controles, alérgicos e intolerantes entre sí, tanto en el porcentaje de células (Tabla 36) como en valores absolutos (Tabla 37).

Sin embargo, es importante destacar las diferencias en el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> con receptor TCR de tipo  $\gamma\delta$  con un nivel de confianza del 90% (Kruskal-Wallis). Así, al comparar con mas precisión estos valores entre los niños controles y los alérgicos, si se observan niveles significativamente inferiores en estos últimos. De igual forma pero con un nivel de confianza del 90%, se observan valores más bajos de CD8<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> en intolerantes que en controles sanos.

Por otra parte, al comparar el grupo de pacientes (alérgicos e intolerantes) con el grupo control de niños sanos, se observan diferencias en cuanto al porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> con receptor  $\gamma\delta$ -TCR y en cuanto al número de células NK. Como se observa en la Tabla 38, los valores de CD8<sup>+</sup> con receptor  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> están disminuidos en pacientes frente a controles. En cambio, el número de células NK (CD56<sup>+</sup>) se encuentra aumentado en pacientes respecto a controles sanos (Tabla 39).

Numerosos estudios han analizado las subpoblaciones linfocitarias en distintas enfermedades alérgicas: asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica. Sin embargo, pocos estudios se han centrado en el estudio de las subpoblaciones de linfocitos en las alergias alimentarias.

En este sentido, al comparar con otros estudios, tampoco se encuentran diferencias en las subpoblaciones linfocitarias entre pacientes asmáticos y controles sanos tanto en niños como en adultos (Gemou-Engesaeth y col., 1994; Corrigan y col., 1993). De igual forma Laan y col. (1998) en niños con dermatitis atópica, con o sin alergia al cacahuete y al comparar con controles sanos, no observan diferencias en las subpoblaciones linfocitarias: CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, NK<sup>+</sup>.

Jarvinen y col. (1998) llevan a cabo un estudio prospectivo de seguimiento desde el nacimiento en 47 niños lactantes (0,4 a 10 meses) con padres atópicos. Se analizan las subpoblaciones de linfocitos en sangre (citometría de flujo) para determinar en estos niños con sospecha de alergia, posibles marcadores del desarrollo de alergia. Del total de niños, 23 siguen sanos y 24 desarrollan posteriormente alergia a las proteínas de la leche. Se observa que los niños con alergia presentan un porcentaje significativamente mayor de linfocitos CD19<sup>+</sup> y menor de linfocitos CD8<sup>+</sup> que los niños sanos. Esto indica que los niños con alergia presentan alteración en la regulación de las células B. Los autores sugieren estos parámetros como posibles marcadores de la alergia alimentaria por ser detectados ya en sangre durante los primeros síntomas alérgicos.

En el presente estudio, aunque no se encuentran diferencias significativas, hay una tendencia a que los porcentajes de CD8<sup>+</sup> sean inferiores, y los de CD19<sup>+</sup> superiores en pacientes que en controles.

Beyer y col. (1998) llevaron a cabo otro estudio en 17 niños con dermatitis atópica y sensibilización a alimentos (huevo o leche) y en 9 niños también con dermatitis atópica pero sin sensibilización alimentaria, con objeto de conocer si las diferencias en los niveles de leucocitos y de subpoblaciones linfocitarias antes y después de la provocación oral pudieran determinar el resultado de las pruebas de provocación oral. Los autores observaron una disminución en el número de leucocitos y de las subpoblaciones de linfocitos CD3<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>, junto con un aumento del cociente CD4/CD8 en los niños con sensibilización alimentaria independientemente del resultado de la provocación oral. Estos cambios reflejan por tanto, alteraciones en el sistema inmune en respuesta a alérgenos, y parecen estar relacionados con la sensibilización alérgica pero no con el resultado de la provocación oral.

Otros grupos de investigación han estudiado la importancia clínica de las alteraciones del sistema inmune en individuos con dermatitis atópica, observando tanto en sangre periférica (Adamek-Guzik y col., 2001) como a nivel cutáneo (Lugovic y col., 2001) un aumento de los linfocitos CD4<sup>+</sup>, una disminución de CD8<sup>+</sup> y por tanto, el

cociente CD4/CD8 superior en atópicos que en controles sanos, además de que únicamente la IgE sérica total se correlaciona con la sintomatología.

En relación a las células NK, los resultados que se presentan en este estudio con niveles más altos en pacientes con alergia/intolerancia frente a controles, se han observado también en adultos con asma alérgico grave frente a otros asmáticos leves y frente a controles sanos (Krejsek y col., 1998). El posible papel de estos niveles aumentados de células NK no es conocido. En estudios recientes se ha descrito la existencia de dos subpoblaciones de células NK: NK1 y NK2, en función del patrón de citoquinas, tipo 1 o tipo 2 que producen. Proponiendo además, a la subpoblación de células NK que segregan IL-13 y no IFN- $\gamma$ , un posible papel en distintas patologías incluidas la alergia (Deniz y col, 2002; Loza y col., 2002; Moretta y col., 2002).

En cuanto a los linfocitos CD8<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup>, los resultados del presente estudio coinciden con los presentados por otros autores en niños con dermatitis atópica (Schauer y col., 1991) o en adultos con asma alérgico (Krejsek y col., 1998; Chen y col., 1996) y fiebre del heno (Chen y col., 1996). En este último estudio, los valores disminuidos de  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup>, no se correlacionan con los valores de IgE sérica total ni con el recuento de eosinófilos, ambos elevados.

Sin embargo, en otros estudios, no se observan diferencias en los porcentajes, fenotipo ni estados de activación de linfocitos en sangre periférica. Así, en 15 adultos con rinitis alérgica perenne (alergia al polvo) y 14 pacientes con rinitis infecciosa, no se observan diferencias a nivel nasal en cuanto a CD3<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, los niveles de CD4<sup>+</sup> y de  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> se encuentran aumentados en los pacientes con rinitis alérgica independientemente de los valores en sangre periférica y, el número de células NK aumentadas en la rinitis infecciosa. Estos resultados indicarían que las células  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> de la mucosa difieren de las de sangre periférica (Pawankar y col., 1995).

Kokkonen y col. (2000) han estudiado en 32 niños alérgicos (20 sin tratamiento y 12 celíacos) y en 12 controles, la expresión de las células T a nivel intraepitelial. Los niños con alergia no sometidos a dieta de exclusión presentaron los mismos porcentajes de CD3<sup>+</sup> pero valores significativamente superiores de células  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> que los alérgicos con dieta

de exclusión y que los controles. Sería interesante conocer también en estos estudios, la relación de estas células T con receptor  $\gamma\delta$ , en sangre periférica.

Hayday y col. (2000) han estudiado el papel potencial de las células T con receptor  $\gamma\delta$  en la respuesta inmune. Su contribución en las mucosas parece ser importante debido a su elevada localización a este nivel. Además, han analizado su papel en infecciones en edades tempranas cuando estas células son más abundantes; comprobándose una menor respuesta de células  $\alpha\beta$ -TCR en relación a las  $\gamma\delta$ . Esta capacidad protectora de las células  $\gamma\delta$  en las primeras etapas de la vida pudiera compensar el desequilibrio Th1-Th2 acelerando el proceso hacia Th1, con la consiguiente implicación de los niveles disminuidos, en la susceptibilidad a desarrollar respuesta alérgica Th2. Considerando por ello, el posible efecto protector frente a la sensibilización alérgica de estas células T con receptor  $\gamma\delta$  (Liberio, 2000), en el presente estudio los niveles significativamente más bajos en los pacientes con alergia/intolerancia a la leche de vaca frente a controles, podrían explicar la falta de tolerancia inmunológica que tiene lugar en ellos. Sería además interesante en el seguimiento de estos pacientes, estudiar la evolución de los mismos y su posible relación con los niveles de células  $\gamma\delta$ -TCR en el momento del diagnóstico.

Se sabe que muchas subpoblaciones de linfocitos están involucradas en la patogénesis de las distintas enfermedades alérgicas. Por ello ha sido interesante analizar éstas, en sangre periférica de niños con alergia alimentaria. Sin embargo, existen pocas referencias en la bibliografía en relación a los distintos cocientes linfocitarios en enfermedades alérgicas, y en concreto en las alergias alimentarias.

En el presente estudio, en relación a los cocientes CD4/CD8, CD3/CD19 y CD2/CD19, no se observan diferencias entre controles, alérgicos e intolerantes (Tabla 36). Se ha sugerido que alteraciones en el cociente entre linfocitos T *helper* y T supresores, pudieran jugar un importante papel en la etiopatogénesis de la alergia a las proteínas de leche (Jarvinen y col., 1998). En nuestro estudio, tanto alérgicos como intolerantes presentaron valores superiores del cociente CD4/CD8, debido a los valores más altos de CD4<sup>+</sup> que presentaron ambos grupos de pacientes. Sin embargo, en los cocientes CD3/CD19 y CD2/CD19, los controles mostraron niveles superiores que los grupos de pacientes, aunque las diferencias no llegan a ser en ningún caso significativas.

En un estudio en 32 individuos con asma estable (14 atópicos y 18 no atópicos) no se observan diferencias en los porcentajes de CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ni en el cociente CD4/CD8 con 10 controles sanos que no presentaban asma ni atopía. Sin embargo, se da una correlación inversa entre el cociente CD4/CD8 y la hiperreactividad bronquial (Harmanci y col., 1998).

## **5.5.2.- SECRECIÓN DE CITOQUINAS**

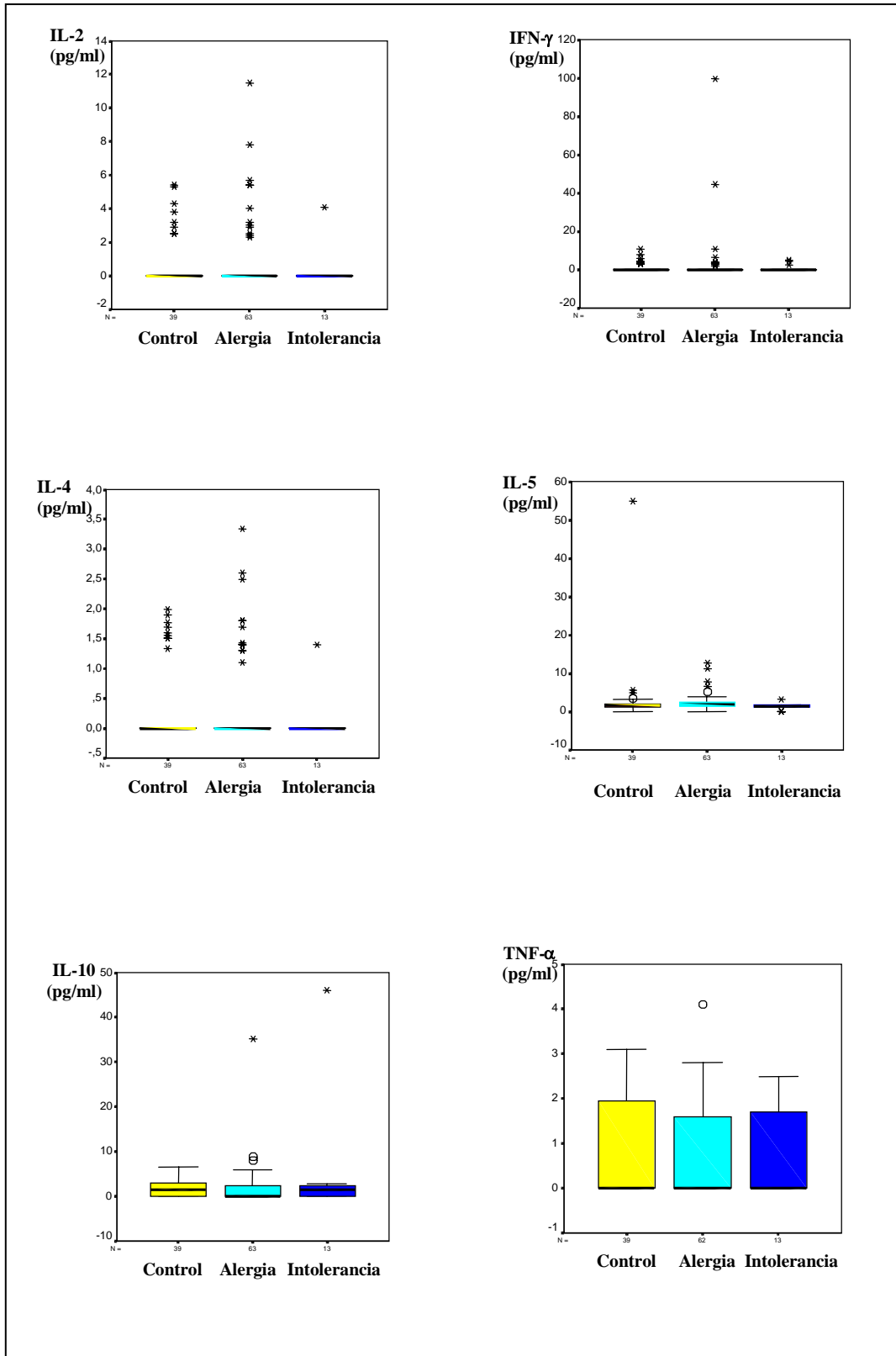
### **5.5.2.1.- SECRECIÓN DE CITOQUINAS “*IN VIVO*”**

En relación a la producción de citoquinas *in vivo* en el gráfico 2 puede observarse la dispersión de los resultados. Únicamente en la secreción de IL-5 se observan diferencias entre controles, alérgicos e intolerantes (Tabla 40). En la Tabla 40A vienen reflejados para cada grupo, los valores de la mediana y del rango intercuartil. Así, en esta tabla se puede observar que los niveles más elevados corresponden a los alérgicos, seguido de controles y por último de los intolerantes; siendo las diferencias significativas únicamente entre alérgicos e intolerantes. También se han observados niveles más altos de IL-5 en pacientes que en controles procedentes de otros estudios en niños con asma o con dermatitis atópica (Koning y col., 1997) y en niños con alergia a las proteínas de leche (Matsumoto y col., 1999). Tras 2 meses de exclusión de la leche de vaca en los niños alérgicos y coincidiendo con la remisión de los síntomas, los altos niveles de IL-5 disminuyen (Matsumoto y col., 1999). Se han encontrado similares resultados en 63 niños (edad media 10,6 años) con alergia alimentaria y síntomas principalmente gastrointestinales (Maciorkowska y col., 2000). En este último la determinación de citoquinas se llevó a cabo a nivel de la mucosa gástrica. Lorentz y col. (1999) también en la mucosa intestinal señalan que en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal se produce un mayor número de células productoras de IL-5 (eosinófilos y mastocitos) al comparar con controles sanos. En otro estudio, Vandezande y col. (1999) encuentran a nivel de la lamina propia que los pacientes con alergia alimentaria seguidos de los atópicos presentan los valores más altos de linfocitos, mastocitos y eosinófilos, mientras que en controles sanos estos valores son indetectables. Además, sólo se detecta la citoquina IL-5 en el grupo de pacientes alérgicos.



**GRÁFICO 2.**

SECRECIÓN DE CITOQUINAS EN CONTROLES, ALÉRGICOS E INTOLERANTES.



Al igual que en el estudio que aquí se presenta, Sütas y col. (2000) tampoco observan diferencias significativas en la secreción de citoquinas en niños de entre 5 y 46 meses de edad (media de 15 meses), con dermatitis atópica y con alergia alimentaria (n=26) o sin ella (n=10), en los que la concentración sérica de IFN- $\gamma$  fue muy baja y de IL-4 indetectable para casi todos los pacientes. Sin embargo, tampoco observan niveles detectables de IL-5.

Este grupo estudia además, el efecto de la provocación oral con el alérgeno sospechoso sobre los niveles de citoquinas circulantes. Para ello determinan estos niveles tras la provocación con el alérgeno. Dicho alérgeno estimula la producción de IL-10 únicamente en los niños con provocación oral positiva, observándose un aumento de esta citoquina después de las pruebas. Por otra parte, los niños con reacción de tipo retardado tras la provocación oral presentan menos IL-10 en suero que los que reaccionan de forma inmediata.

En el estudio que aquí se presenta no se observan diferencias en la secreción de IL-10 en relación al tiempo de reacción tras la prueba de provocación oral. Es decir, los niveles de IL-10 son similares en los niños independientemente de que reaccionen de forma inmediata o retardada a las pruebas de provocación.

La población del estudio es, no obstante, de distintas características a las que en el presente estudio se observan, por tratarse de niños, todos ellos, con dermatitis atópica. Además, una alta proporción de niños alérgicos presentan tras las pruebas de provocación oral, reacción de tipo retardada; mientras que en el estudio que se presenta aquí la mayor parte de los niños alérgicos reaccionan de forma inmediata a la provocación oral.

En el presente estudio, los alérgicos muestran valores más altos para todas las citoquinas que los intolerantes, excepto para la IL-10 y el TNF- $\alpha$  que son superiores en los intolerantes. Sin embargo, y con excepción para la IL-5, las diferencias no son significativas en ningún caso.

Hauer y col. (1997) estudian la frecuencia de células que segregan de forma espontánea distintas interleuquinas en sangre y mucosa intestinal en niños con alergia o

con enteropatía a las proteínas de la leche de vaca y en controles sanos. En sangre, se observan niveles más elevados de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 y IL-10 en ambos grupos de pacientes al comparar con controles. Los resultados muestran por tanto, en general aumento de citoquinas tanto Th1 como Th2. En la lámina propia también observan un aumento de células productoras de IFN- $\gamma$  y de IL-4 en los niños con enteropatía al comparar con controles; siendo el número de células productoras de IFN- $\gamma$  10 veces superior que las células que secretan IL-4, por lo que se observa un predominio de respuesta Th1 tanto en pacientes con enteropatía como en controles.

Al considerar los pacientes (alérgicos e intolerantes) como un único grupo y comparar la secreción de citoquinas con el grupo control de niños sanos, no se observan diferencias para ninguna de ellas (Tabla 41).

Ya se ha mencionado anteriormente la importancia de la IL-5 en la producción y activación de los eosinófilos. Se ha observado la presencia de estos granulocitos en los infiltrados inflamatorios de la fase tardía de las reacciones inmediatas, aunque no se sabe bien si son reclutados de forma selectiva en las reacciones inflamatorias o si su presencia es simplemente reflejo de su incremento en sangre. Los niveles aumentados de eosinófilos en sangre de individuos atópicos podrían sugerir que su producción está regulada por las mismas células T que regulan la síntesis de IgE (Sanchez-Pérez, 1998).

La elevada respuesta de IgE junto con la eosinofilia que se observa en pacientes con dermatitis atópica pudiera reflejar un exceso en la respuesta tipo Th2 junto con una disminución en la producción de IFN- $\gamma$ . Yoshizawa y col. (2002) estudian los niveles de IL-18, IL-10, IL-2 e IFN- $\gamma$  en suero para evaluar su posible relación con la severidad de los síntomas la enfermedad. Sólo observan niveles más elevados de IL-18 en los pacientes atópicos frente a controles sanos y una correlación inversa entre IL-2 y la IgE sérica. Esta correlación inversa podría sugerir que la producción de IgE es inhibida por la IL-2 en los pacientes con dermatitis atópica. En el presente estudio no se observa correlación alguna entre estos parámetros.

En el estudio que aquí se presenta y a diferencia de la mayor parte de estudios, la extracción de sangre tiene lugar antes de las pruebas de provocación oral con el alergen

sospechoso. Por ello, hay que considerar que para llevar a cabo estas pruebas de provocación es necesario un tiempo previo de eliminación del alimento sospechoso causante de la reacción adversa. En el estudio que aquí se presenta este periodo de exclusión de la leche de vaca de la dieta, es de entre 3 a 4 semanas. Este hecho podría quizás justificar el distinto patrón de alguna de las citoquinas discutidas al comparar con otros estudios llevados a cabo en que la determinación de citoquinas en suero se determina tras provocación oral con el alergeno sospechoso.

#### **5.2.2.2.- SECRECIÓN DE CITOQUINAS “*IN VITRO*”**

Como se explicó en el apartado “Sujetos y Métodos” la secreción de citoquinas “*in vitro*” fue determinada en sobrenadante de cultivos. Esta producción de citoquinas por parte de las células mononucleares de sangre periférica tiene lugar tras estimulación de los linfocitos con mitógeno (PHA), con alérgenos (BLG o CAS) o, sin estimulación, en medio de cultivo. Los resultados relativos a la producción de citoquinas se encuentran representados en las Tablas 42 - 57.

Es de destacar la variabilidad intragrupal que procede de pocos casos muy extremos, como se puede observar en las grandes desviaciones estándar que presentaron todas y cada una de la citoquinas estudiadas. Los resultados de algunas de ellas se pueden observar en el Gráfico 3. Por ello, además de presentar los valores medios se optó por presentar el valor de la mediana y el rango intercuartil (Tablas 42A - 57A).

Al comparar la producción de las distintas citoquinas entre los 3 grupos estudiados, no se observaron diferencias significativas en cuanto a las siguientes citoquinas: IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , para ninguna de las condiciones de cultivo utilizadas. Solamente, en la producción de IL-5 e IL-2, tras estimulación con PHA y con CAS, respectivamente se observaron diferencias entre los controles, alérgicos e intolerantes. En concreto, la producción de IL-2 tras estimulación con CAS fue superior en los intolerantes que en controles o en alérgicos (Tabla 44). En cuanto a la IL-5, el grupo de alérgicos presentó valores superiores que los otros 2 (Tabla 48).

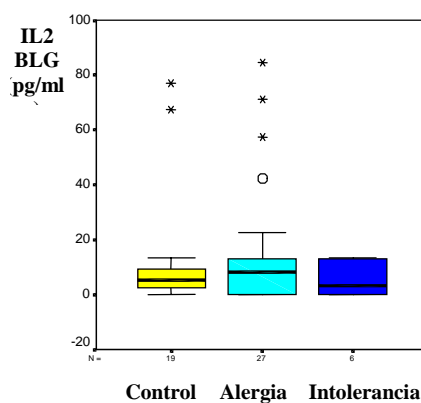
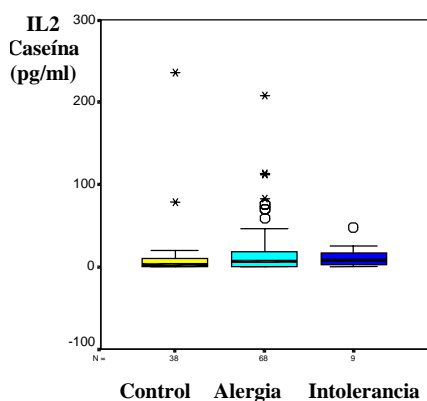
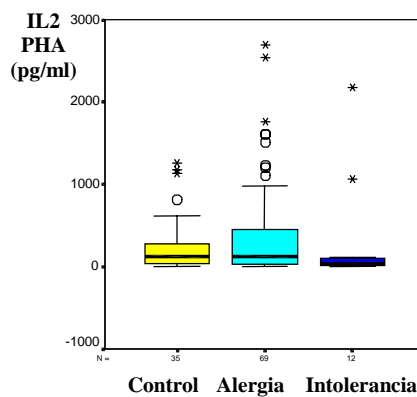
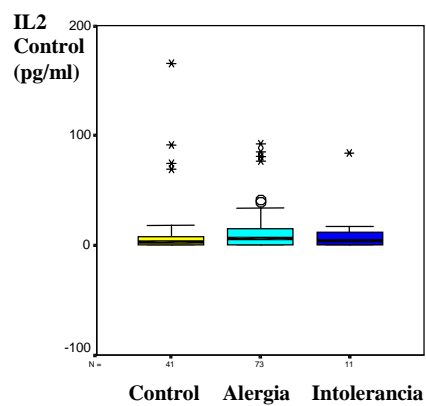
Se han obtenido resultados similares en 59 niños de entre 6 meses y 5 años con alergia al huevo (Ng y col., 2002). Los autores analizan la producción de IL-4 e IFN- $\gamma$  por clones de linfocitos CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> específicos frente a la caseína, observando capacidad de respuesta tanto Th1 como Th2. Este grupo de niños sería comparable con el grupo de niños alérgicos que aquí se presenta (la mayoría con reacción inmediata, síntomas cutáneos y valores de IgE específica positivos). El resultado es semejante en el tipo de respuesta Th1/Th2 que observan estos autores para los niños alérgicos. Sin embargo, estos autores no analizan la producción de citoquinas en el grupo de 15 niños que consideran controles: con DA pero sin reacción ante la provocación oral y niveles negativos de IgE específica frente a la leche. En ese sentido, no se puede comparar con el presente estudio en el que no se observan diferencias con los niños del grupo control.

Al comparar el grupo de niños alérgicos con el de intolerantes, se observaron diferencias significativas en la producción de IL-10 inducida por BLG (Tabla 50), y de IL-4 (Tabla 46), IL-5 (Tabla 48), IFN- $\gamma$  (Tabla 42) tras estimulación con PHA, presentando para todos los casos los niños alérgicos, valores superiores a los intolerantes.

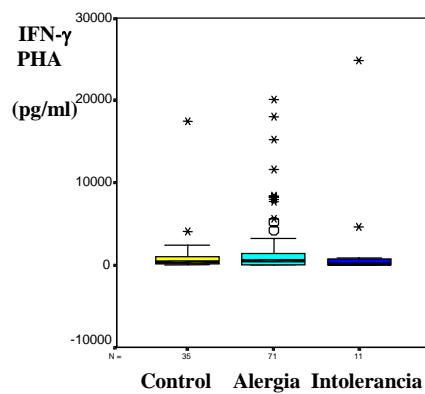
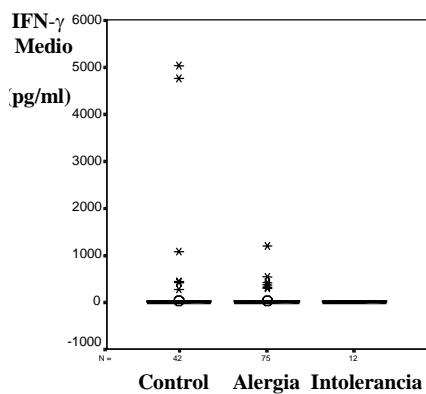
Cuando se comparan para cada grupo de niños estudiados, las diferencias en la producción de citoquinas en función de las condiciones de cultivo, se encontraron siempre diferencias significativas entre los distintos medios de cultivo utilizados: sin estimulación, con PHA o con alérgenos (CAS o BLG). Así por ejemplo, la producción de IL-4 (Tabla 46) y la de IL-6 (Tabla 56) siguen el mismo patrón en todos los grupos estudiados: sólo se observaron valores superiores tras estimulación con PHA. En cuanto a la producción de IL-5, en todos los grupos fue superior con PHA, pero además, en ambos grupos de pacientes se encontraron niveles superiores tras estimulación con CAS que en el medio de cultivo sin estimular (Tabla 48).

**GRÁFICO 3. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTE DE CULTIVO.**

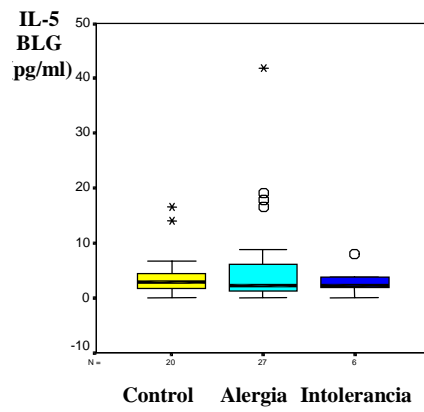
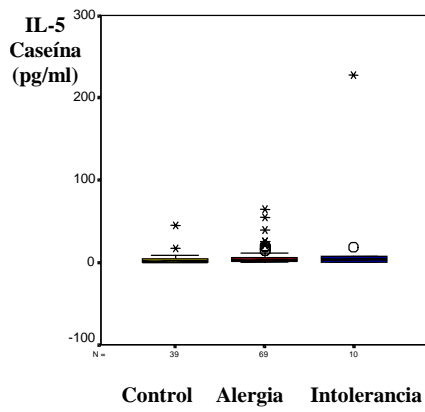
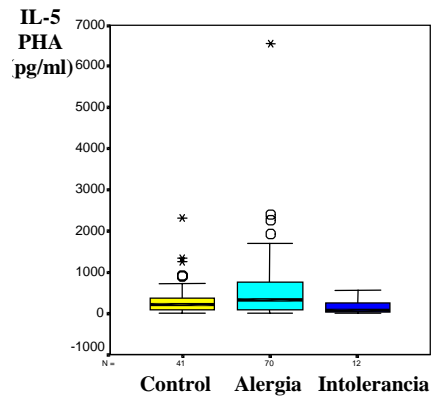
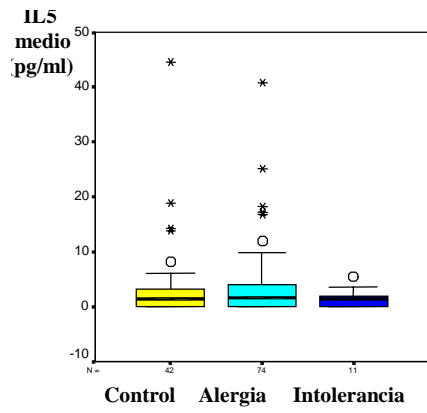
IL-2



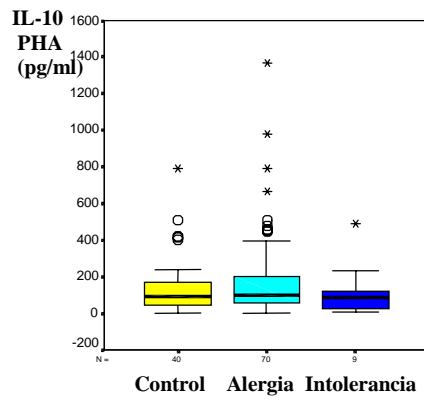
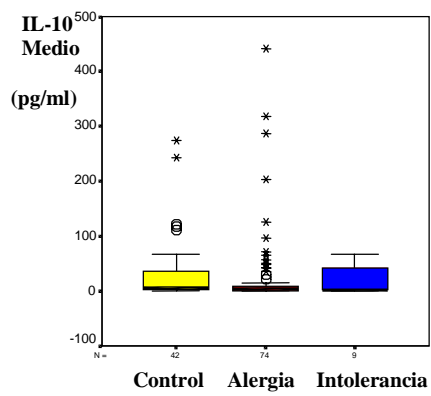
IFN- $\gamma$

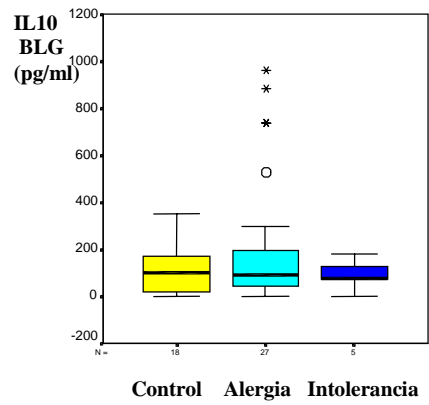
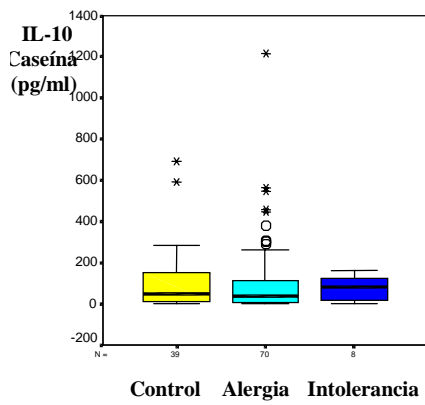


IL-5

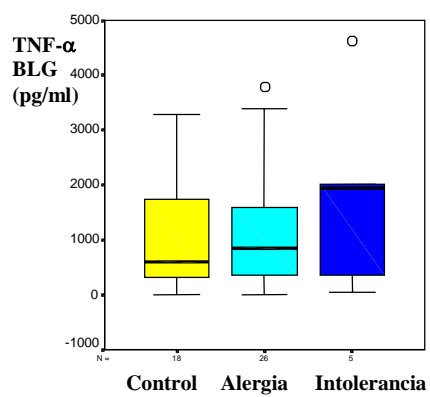
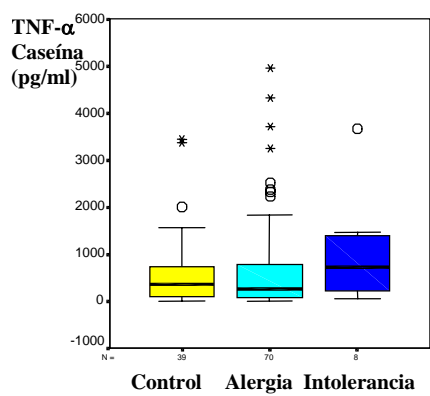
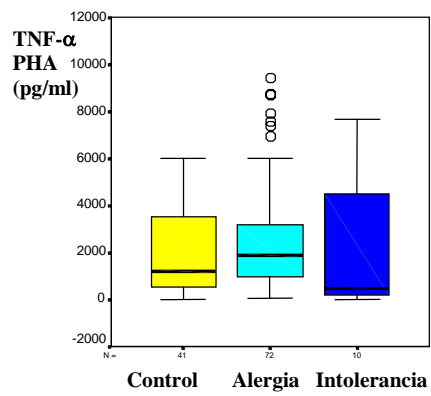
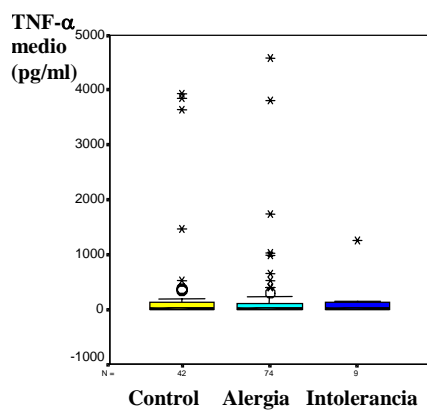


IL-10





TNF- $\alpha$





Por otra parte, al considerar a los pacientes como un solo grupo, éstos presentaron valores de IL-2 superiores a los controles, pero las diferencias sólo fueron significativas en la estimulación con CAS (Tabla 45). De igual forma ocurre con la IL-5, encontrándose valores más altos en pacientes que en controles pero con diferencias significativas solamente tras estimulación con CAS (Tabla 49). Es decir, la capacidad de producción de IL-2 e IL-5 tras estimulación con la CAS fue superior en los pacientes que en controles. Por lo tanto, se observa según este resultado un patrón de citoquinas tanto Th1 como Th2 en los pacientes.

Reekers y col. (1996) analizan el papel de los linfocitos T específicos frente a alérgenos alimentarios en 11 niños alérgicos con DA y niveles de IgE específica frente a la leche positivos. 7 de estos niños, además del empeoramiento del eczema que presentan tras las pruebas de provocación oral con leche que tiene lugar en todos los niños, reaccionan de forma inmediata tras esta prueba.

En otro estudio, Werfel y col. (1996) caracterizan clones de células T específicas frente a la caseína en adultos con DA y alérgicos a la leche. Observan una producción muy baja o indetectable de IL-4.

En el presente estudio, la producción de IL-10 tras estimulación policlonal (PHA) es superior en alérgicos; pero tras estimulación alérgica o sin estimular los valores mayores corresponden a los controles sanos; presentando los intolerantes los niveles más bajos. Debido a la alta dispersión de datos no puede probarse si las diferencias entre los 3 grupos son significativas. Sin embargo, al comparar de forma más precisa la concentración de IL-10 tras estimulación con BLG se observaron diferencias significativas entre alérgicos e intolerantes. Como consecuencia del efecto inhibitorio de la IL-10, esta capacidad disminuida sería la responsable de la falta de desarrollo de tolerancia oral en estos niños. Resultados similares han sido obtenidos por Sütas y col. (2000).

En algunos estudios no se detectan niveles de IL-4 o de otras citoquinas en sobrenadante de cultivo tras estimulación de linfocitos con el alérgeno alimentario mediante la técnica de ELISA. Por ejemplo, Laan y col. (1998) determinan también la

expresión del mRNA para estas citoquinas en niños con DA y alérgicos o no, al cacahuete. En los niños alérgicos observan una correlación positiva entre la respuesta proliferativa y la expresión de IL-4 mRNA tras estimulación con extracto de cacahuete.

Como se observa en el Cuadro 5, los resultados de los distintos estudios son a veces contradictorios. Algunos estudios muestran respuesta Th2 en los pacientes alérgicos mientras que en otros existe incapacidad para secretar IFN- $\gamma$ , o no se observan diferencias en la producción de IL-4.

En el estudio que aquí se presenta la respuesta de IL-5 es la que refleja más claramente el estado alérgico. En otros estudios, se detecta una incapacidad en la producción de citoquinas Th1 presentándose un exceso de respuesta Th2. En el presente estudio, no se observa una incapacidad para producir IFN- $\gamma$  (Th1) sino más bien, una dualidad de respuesta Th1 y Th2.

**CUADRO 5. RESUMEN DE ESTUDIOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS POR LINFOCITOS ESTIMULADOS CON EL ALERGENO ALIMENTARIO.**

Nº Pacientes (N) Nº Controles (C)	Tipo de Alergia Estimulación (cultivo)	Resultados	Referencia
Niños N=11, DA+Alergia C=15, DA	Leche de vaca o huevo Caseína	Alergia+DA: IL-4 ↑ IFN-γ ↑	Reekers y col. 1996
Adultos N=22, DA+Alergia N=66, DA solo C	Leche de vaca Caseína	Alergia+DA: IFN-γ ↑	Werfel y col. 1997
Niños (media 3,2m) N=31, Alergia C=12	Leche de vaca Concavalina A	Alergia: < IFN-γ < TNF-α IL-4 indetectable	Osterlund y col. 1999
Niños (8m-3a) N=25: 5 urticaria (r. inmediata) 19 DA (r. retardada) 7(r.inmediata+retardada) C=10	Huevo OVA	DA: > IFN- que r. inmediata y controles IL-4: diferencias NS	Shinbara y col. 1996
Niños N=9, Alergia+DA (3,1±2,9) C=5 (3,6±2,1)	Huevo OVA	Alergia: < IFN-γ IL-4: diferencias NS	Noma y col. 1996
Adultos N=9, Alergia (6-53a) C=12: 6 Asma (25-44a) 6 Sanos (30-46a)	Cacahuete Ara h2	Alergia: < IFN-γ IL-4: diferencias NS	Dorion y col 1994
Adultos N=5, Alergia (26a) C=4 (30a)	Cacahuete Extracto de cacahuete	Alergia: > IL-4 < IFN-γ	Higgins y col. 1995
Adultos N=7, Alergia (27±6,7a) C=10 (31±10a)	Cacahuete Extracto de cacahuete	Alergia: > IL-4 < IFN-γ	De Jong y col. 1996
Niños (46-51m) N=13, DA+alergia N=8, DA C=8	Cacahuete Extracto de cacahuete	Alergia: > IL-4 IFN-γ: diferencias NS	Laan y col. 1998

DA = dermatitis atópica; NS = no significativas

### 5.5.3.- PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS ESTIMULADOS

Como se explicaba en la sección de Sujetos y Métodos, las células mononucleares de sangre periférica se cultivan sin estimulación o, con estimulación por mitógeno (PHA) o con alérgenos alimentarios (BLG o CAS). Los resultados vienen expresados en cuentas por minuto (cpm) y en índice de estimulación (SI, *stimulation index*), que corresponde al cociente entre la respuesta proliferativa (cpm) tras estimulación y sin estimulación, en medio de cultivo.

En ninguna de estas condiciones de cultivo se observan diferencias significativas en la proliferación de linfocitos entre controles, alérgicos e intolerantes (Tablas 58, 59). En relación a la estimulación con los alérgenos alimentarios, los niños alérgicos presentan mayor proliferación pero las diferencias no son significativas. Estos resultados se han observado en otros estudios con características similares en cuanto la población estudiada. Así, Hoffman y col. (1997) comparan la respuesta proliferativa de células T frente a la leche de vaca, soja, antígeno del tétanos o sin estimulación, en 27 niños alérgicos, 9 con enterocolitis inducida por leche de vaca y 21 controles sanos. Debido también a la gran dispersión de los datos no observan diferencias entre grupos, presentando también el grupo de controles sanos, reactividad a la leche.

Sin embargo, en otros estudios sí se observan diferencias entre los distintos grupos de pacientes, y al comparar con controles sanos. Por ejemplo, Reekers y col. (1996) muestran cómo en niños con dermatitis atópica, los que reaccionan a la leche de vaca presentan un SI (con CAS) más alto que los niños con provocación oral a la leche de vaca negativa.

De igual forma, en adultos con dermatitis atópica Werfel y col. (1997) demuestran la existencia de una mayor respuesta proliferativa con leche en los individuos con agravación de la DA tras la provocación con leche que en los individuos en los que la dermatitis no empeora tras provocación y que en controles sanos. Sin embargo, no observan diferencias en el SI tras estimulación con PHA y sin estimular. Además, los

valores de IgE específica no se correlacionan con la proliferación linfocitaria tras estimulación con los antígenos correspondientes.

En otro estudio, Suomalainen y col. (1994) miden la proliferación de linfocitos estimulados con leche o sin estimulación (con medio de cultivo), en 44 niños (15,7 meses) antes de la provocación oral con leche. Los niños con síntomas gastrointestinales (39%) presentan mayor SI que los niños con síntomas cutáneos (20%) tras la provocación oral y que los que no responden a la misma (controles). Además, en los niños alérgicos la proliferación espontánea, en medio de cultivo sin estimular, es mayor que en los controles.

Además, hay que destacar que para cada grupo de estudio, los valores más altos corresponden a la estimulación con PHA seguido de la estimulación con el alergen alimentario (Tabla 58).

Por otra parte, y como se puede observar en las tablas 58 y 58A, para cada grupo de niños de estudio, se presentan diferencias en la respuesta proliferativa de linfocitos en función del medio de cultivo, tanto en los grupos de pacientes como en controles. En todos los casos la proliferación de linfocitos es significativamente superior en la estimulación con PHA que con las proteínas alergénicas (CAS o BLG) o que con medio de cultivo, sin estimulación. Además, en los niños alérgicos la respuesta proliferativa a alergen alimentarios es mayor que sin estimulación con excepción de entre sin estimular y tras estimulación con BLG, que aunque es superior, las diferencias no llegan a ser significativas.

Al comparar el grupo de pacientes frente a controles, en general todos los valores son más altos en el grupo de pacientes (alérgicos e intolerantes) que en controles, menos en condiciones de cultivo sin estimulación. Sin embargo, debido a la alta dispersión de los datos, las diferencias en la respuesta proliferativa entre pacientes y controles no llegan a ser significativas (Tablas 60, 61).

Como se puede observar en el Cuadro 6, en el que se exponen los resultados de diversos estudios y para grupos de población distintos en cuanto a edad y tipo de alergia alimentaria, los resultados son a veces contradictorios.

En el estudio que presentamos, la respuesta proliferativa de linfocitos presenta un rango de valores muy disperso con solapamiento entre los distintos grupos. Esta alta dispersión es también observada en otros estudios. Por ejemplo, tras estimulación con PHA o con alérgeno alimentario y para unos valores de medias de 4304 y 2310 cpm, se presentan rangos de valores de entre 274-298700 y 20-292338, respectivamente (Hourihane y col., 1998).

Además, en el estudio que presentamos, algunos niños del grupo control muestran una alta respuesta proliferativa, mientras que en otros niños alérgicos, la respuesta proliferativa es baja.

Esto se observa también en otros estudios revisados. Así, en 114 niños con problemas gastrointestinales: 42 con sospecha de intolerancia a las proteínas de la leche (solo se confirma en 34), 42 con diarrea por distintas causas, 12 con intolerancia al gluten y 18 controles, Baudon y col. (1987) llevan a cabo el test de proliferación de linfocitos estimulando con CAS y BLG. De los 34 niños en que se confirma intolerancia a la leche de vaca, un 79% presentan respuesta proliferativa. En el resto de niños con sospecha de intolerancia pero con provocación oral negativa (n=8), un 62% presenta respuesta en la proliferación de linfocitos. En los otros grupos estudiados, niños con diarrea o con intolerancia al glúten, entre un 12-27% no presentan respuesta proliferativa. Sin embargo, el grupo control no presenta nada de respuesta. Es decir, en un porcentaje de niños sanos, sin reacción adversa a la leche de vaca y en otros, con distintos problemas gastrointestinales, se observa *in vitro* respuesta proliferativa de los linfocitos. Por ello, y a pesar de las diferencias con controles sanos, los autores concluyen que estos tests no tienen la suficiente especificidad para ser fiables para el diagnóstico.

En el estudio realizado por Higgins y col. (1995) se observa que las células T de adultos, tanto procedentes de alérgicos a frutos secos con historial de anafilaxis como de controles no atópicos, proliferan frente a distintos extractos de frutos secos en un rango entre 6100 y 83300 cpm. La respuesta en los pacientes atópicos es mayor para el cacahuete y la avellana que en los controles, pero las diferencias no llegan a ser significativas. La proliferación de linfocitos sin estimular se encuentran en un rango entre 500 y 13100 cpm.

Además, la respuesta proliferativa de las células T de individuos atópicos no se correlaciona con los niveles de IgE específica en suero. Esta falta de correlación entre la proliferación linfocitaria frente al antígeno y los valores de IgE se muestran también en el estudio presentado por Hourihane y col. (1998) en pacientes con alergia al cacahuete en comparación con controles sanos. Tampoco se asocia esta respuesta linfocitaria con la severidad de los síntomas, la respuesta al test cutáneo o los valores de IgE específica.

En la alergia al cacahuete, se ha sugerido como causa de la mayor respuesta proliferativa de linfocitos sin estimular o tras estimulación con PHA, la frecuente e inevitable exposición al cacahuete (Sampson y Ho, 1995; Hourihane y col., 1997). Estas dosis frecuentes de exposición de forma intermitente activan a las células T sensibilizadas, lo contrario que ocurre con la exposición a bajas dosis de alergen que disminuyen la reacción alérgica en la alergia a aeroalergenos (Hourihane y col., 1998).

Como se puede observar en la cuadro II de los resultados de estudios revisados, las edades de los grupos estudiados es variable, incluso dentro de una misma población de estudio se incluyen niños y adultos con rangos de edades amplios, tanto para niños (1-14 años) como en adultos (15-37 años) (Hourihane y col., 1998). Así mismo, en relación a los criterios de inclusión en el grupo de población estudiada se observan también diferencias.

Estos resultados parecen indicar que el test de proliferación de linfocitos no tiene carácter diagnóstico ni predictivo de reactividad clínica en pacientes con alergia a las proteínas de la leche.

CUADRO 6. RESUMEN DE ESTUDIOS SOBRE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS.

Nº Pacientes (N) Nº Controles (C)	Tipo de Alergia Estimulación (cultivo)	Respuesta proliferativa	Referencia
N=42, Sospecha intolerancia N=42, Diarrea N=12, Intolerancia al glúten C=18; Niños	De los 42 con sospecha: 8 provocación negativa Caseína, BLG, ALA	Mayor en pacientes que en controles; pero también en 5/8 con sospecha de intolerancia: test +	Baudon y col. 1987
N=26; Alergia+intolerancia C=25	Leche de vaca Caseína, BLG	Mayor en alergia/intolerancia	Albani y col. 1989
N=10, Alergia C=15 Niños	Leche de vaca Leche de vaca (alergeno para estimulación cultivo)	No diferencias con controles. Ni tras 3 meses con dieta de exclusión.	Eigenmann y col. 1995
N=11, DA+alergia C=15, DA solo Niños	Leche de vaca o huevo Caseína	Mayor en DA + alergia que sin alergia	Reekers y col. 1996
N=22, DA+alergia N=66, DA solo C; Adultos	Leche de vaca Caseína	Mayor en DA + alergia que sin alergia o controles	Werfel y col. 1997
N=27, Alergia: leche N=9, Enterocolitis: por leche C=21; Niños	Leche de vaca Leche, PHA, sin estimular	- Mayor en alérgicos - Diferencias NS entre pacientes	Hoffman y col. 1997
N=9, Alergia; C=12; Adultos	Cacahuete Ara h2	Diferencias NS	Dorion y col 1994
N=5, Alergia C=4; Adultos	Cacahuete Extracto de cacahuete	Diferencias NS	Higgins y col. 1995
N=7, Alergia C=10; Adultos	Cacahuete Extracto de cacahuete	Mayor en alérgicos	De Jong y col. 1996
N=44, Alergia Niños (30), Adultos (14) C=13; Adultos	Cacahuete Extracto de cacahuete	Mayor en alérgicos	Hourihane y col. 1998
N=13, DA+alergia N=8, DA solo C=8; Niños	Cacahuete Extracto de cacahuete	Mayor en DA + alergia que sin alergia o controles	Laan y col. 1998
DA+alergia (n=27) n=11, r. inmediata n=16, r. retardada Niños	Huevo Ovalbúmina	Mayor en pacientes con r. retardada	Fukutomi y col. 1994

DA = dermatitis atópica; NS = no significativas



## 6.- CONCLUSIONES

Con el fin de contribuir a un mejor conocimiento del mecanismo biológico de la alergia y de la intolerancia a las proteínas de la leche de vaca, se evaluó un grupo de 139 niños que fueron remitidos por su pediatra al Hospital bajo sospecha de alergia a las proteínas de la leche. El estudio se llevó a cabo durante un periodo de 20 meses (Junio 2000 - Febrero 2002).

Se determinaron en todos los niños los parámetros antropométricos y hematológicos, así como los inmunológicos para evaluar la presencia de IgE y de un posible mecanismo inmunológico mediado por células. Se llevaron también a cabo pruebas de provocación oral con la fórmula láctea infantil, conteniendo como alérgeno sospechoso las proteínas de la leche de vaca. Además, se evaluaron la historia clínica y los antecedentes familiares del niño. En función de las pruebas de provocación oral y de las pruebas inmunes, los niños fueron agrupados en alérgicos, intolerantes y controles sanos.

De los resultados expuestos podemos concluir:

### **CONCLUSIÓN PRIMERA: SOBRE EL DIAGNÓSTICO DE LA ALERGIA/INTOLERANCIA**

1. En función de los resultados de las pruebas diagnósticas de la alergia/intolerancia a las proteínas de la leche, es de destacar el alto porcentaje de niños que presentan alergia (56,8%) frente a una menor incidencia de niños intolerantes (11,5%) durante los 18 meses que ha durado la toma de muestra en el Hospital 12 de Octubre.

### **CONCLUSIÓN SEGUNDA: SOBRE LOS PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS**

1. De acuerdo con los resultados obtenidos en los parámetros antropométricos, y en particular en cuanto al peso y al índice de masa corporal, los niños con intolerancia a las proteínas de la leche, constituyen el grupo que con más frecuencia presenta menor

peso. Por ello, aunque aplicable para todos los niños que reciben fórmulas hidrolizadas, son los pacientes intolerantes los que precisarían un seguimiento más individualizado que pueda asegurar un crecimiento y desarrollo normales.

### **CONCLUSIÓN TERCERA: SOBRE EL SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES**

1. En relación a la evolución de los pacientes tras un año de seguimiento, ésta es muy distinta según el grupo de pacientes. Así, mientras que en la mayor parte de los niños alérgicos persiste la enfermedad, los niños con intolerancia desarrollan alergia o tolerancia en la misma proporción, y tan sólo en un pequeño porcentaje persiste la intolerancia. Esta situación en los niños intolerantes podría explicarse como una fase subclínica de la alergia en la que la sensibilización es tan tenue que no puede detectarse mediante los tests utilizados.
2. De acuerdo con estos resultados sería interesante llevar a cabo un seguimiento más prolongado de los pacientes para determinar la posible correlación entre la evolución de los pacientes (persistencia de la alergia a la leche, aparición de alergias a otros alimentos, a aeroalergenos) con los parámetros al diagnóstico de la enfermedad. Se permitiría así además, identificar posibles marcadores de la persistencia de alergia o desarrollo de tolerancia.
3. Sería también interesante llevar a cabo un seguimiento de los niños del grupo control que presentaban resultados positivos en algunas de las pruebas inmunes de evaluación de la posible implicación de un mecanismo inmunológico. De esta manera se podría controlar en estos niños el posible desarrollo posterior de alergia alimentaria o algún otro tipo de manifestación alérgica.

### **CONCLUSIÓN CUARTA: SOBRE LA INMUNIDAD CELULAR**

1. En relación a las pruebas de determinación de la inmunidad celular, y en concreto de la proliferación de linfocitos estimulados por el alérgeno sospechoso, no se observaron diferencias significativas entre los controles sanos, los niños alérgicos y los

intolerantes. Por ello, y según estos resultados esta prueba carece de valor diagnóstico y diferencial entre la alergia e intolerancia alimentaria.

2. En cuanto a las subpoblaciones de linfocitos hay que resaltar las diferencias observadas en el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> con receptor  $\gamma\delta$ . En concreto, los niveles inferiores observados en los pacientes con alergia e intolerancia frente a los niños sanos. Este parámetro podría ser de interés como posible marcador biológico de las alergias alimentarias. De igual forma los valores aumentados en el número de células NK podrían estar relacionados con el estado alérgico. Debido al conocimiento reciente que se tiene sobre los subtipos de células NK según el patrón de citoquinas que producen (Th1 o Th2); sería interesante realizar más estudios para una mejor comprensión de su implicación en el mecanismo de la alergia/intolerancia alimentaria.
3. En la estimación de la capacidad de las células mononucleares de sangre periférica de producir citoquinas para la valoración de la funcionalidad de las células T y para determinar la posible alteración del equilibrio Th1 y Th2, no se observaron diferencias entre los 3 grupos estudiados.

### **CONCLUSIÓN GENERAL:**

En los últimos años numerosos grupos de investigación han estudiado la inmunidad humoral y celular en reacciones adversas a las proteínas de la leche de vaca (alergia/intolerancia). Sin embargo, debido sobre todo a la distinta terminología, criterios diagnósticos y variabilidad en los sujetos de estudio, muchos de los resultados son dispares y no siempre comparables entre sí.

En relación a las pruebas inmunes *in vitro*, los numerosos estudios han utilizado distintas proteínas alérgicas, a distintas concentraciones y horas de cultivo. Todos estos factores podrían explicar la variabilidad de los resultados.

Por todo ello, sería conveniente seleccionar grupos más específicos en cuanto a las poblaciones de estudio para una mejor interpretación de los resultados y su correcta comparación con otros estudios.

En la mayor parte de las reacciones adversas debidas a la leche de vaca está implicado un mecanismo inmunológico mediado principalmente por IgE siendo las manifestaciones más frecuentes las de tipo inmediato. Las reacciones en las que no parece estar implicado el sistema inmune, o dicho de otra manera, en las que no es posible confirmar un mecanismo inmunológico, reacciones de intolerancia, podrían tratarse en algunos casos, de reacciones mediadas en una primera fase por otro mecanismo de hipersensibilidad no mediado por IgE, por lo que no son detectadas por los tests de diagnósticos habituales.

## **7.- BIBLIOGRAFÍA**

Aba-Alkahail BA, El-Gamal FM. Prevalence of food allergy in asthmatic patients. Saudi Med J 2000; 21(1):81-87.

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds). En: Cellular and Molecular Immunology. 4<sup>a</sup> ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 2001.

Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Allergen immunotherapy for asthma. Cochrane Database Syst Rev 2000;(2).

Adamek-Guzik T, Guzik TJ, Bzowska M, Czerniawska-Mysik G, Szmyd D, Miedzobrodzki J, Pryjma J. Selected parameters of the cellular and humoral immunity in atopic dermatitis. Przeg Lek 2001;58(12):1029-1033.

Adlerberth I, Hanson LA, Wold AE. Ontogeny of the intestinal flora. In: Sanderson IR, Walker WA, eds. Development of the gastrointestinal tract. Hamilton, Ontario: BC Decker Inc., 1999;279-292.

Albani S, Avanzini MA, Plebani A, Scotta MS, Perversi S, Licardi G, Ugazio AG, Burgio GR. Diagnostic value of a lymphocyte stimulation test in cow milk protein intolerance. Ann Allergy 1989 Dec;63(6 Pt 1):489-492.

Alm JS, Swartz J, Lilja G, Scheynius A, Pershagen G. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. Lancet 1999;353:1485-1488.

Alvarado MI, Alonso E, Alvarez M, Ibáñez MK, Laso MT. Persistencia de sensibilización a proteínas de leche de vaca: estudio clínico. Allergol et Immunopathol 2000;28:189.

Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Canton R, Nombela C, Sánchez-Pérez M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. Clinical Microbiology Reviews 2000;177:95.

American Academy of Allergy and Immunology/NIAID, 1984. Anderson JA, Sogn DD, eds. Adverse reactions to foods. NIH Publication 84-2442.1984:1-6.

Anderson JA. Milk, eggs and peanuts: food allergies in children. *Am Fam Physician* 1997 Oct 1;56(5):1365-74.

Andrés de Llano MC, Sánchez A, Andrés JM, Aldana J, Sánchez MJ, Carnicero S, Alberola S, Aguilera L. Intolerancia a proteínas vacunas (IPV) en el área sanitaria de Palencia en los últimos cinco años. Estudio de IgE específica. *Bol Pediatr* 1997;37:101-106.

Bae SJ, Tanaka Y, Hakugawa J, Katayama Y. Interleukin-5 involvement in ovalbumin-induced eosinophil infiltration in mouse food-allergy model. *J Dermatol Sci* 1999;21:1-7.

Baró L, Jimenez J, Martínez-Férez A, Boza JJ. Componentes biológicamente activos de la leche materna. *Ars Pharmaceutica* 2001;42(1):21-38.

Baudon JJ, Mougnot JF, Didry JR. Lymphoblastic stimulation test with food proteins in digestive intolerance to cow's milk and in infant diarrheas. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1987;6(2):244-251.

Bauer A, Ekanayake MS, Wigger-Alberti W, Elsner P. Oral rush desensitization to milk. *Allergy* 1999;54:894-895.

Belli DC, Eigenmann PA, Brighi L et al. Eosinophile Kolitis beim gestillten Säugling. *Monatschrift für Kinderheilkunde* 1994;142(S3);17-19.

Bender A, Matthews D. Adverse reactions to food. *Br J Nutr* 1981;46:403-407.

Berg DJ, Leach MW, Kuhn R, Rajewsky K, Müller W, Davidson NJ, Rennick D. Interleukin-10 but not interleukin-4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med* 1995;182:99-108.

Bergmann R, Woodcock A. Whole population or high-risk group? Childhood asthma. *Eur Respir J Suppl* 1998 Jul;27:9-12.

Bergmann RL, Edenharter G, Bergmann KE, Guggenmoos-Holzmann Y, Forster J, Bauer CP, Wahn V, Zepp F, Wahn U. Predictability of early atopy by cord blood-IgE and parental history. *Clin Exp Allergy* 1997;27:752-760.

Bernhisel-Broadvent J. Allergenic cross-reactivity of foods and characterization of food allergens and extracts. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;75:295-303.

Berrens L, Homedes IB. Relationship between IgE and IgG antibodies in type I allergy. *Allerg Immunol (Leipz)* 1991;37(3-4):131-137.

Beyer K, Niggemann B, Nasert S, Renz H, Wahn U. Severe allergic reactions to foods are predicted by increases of CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T cells and loss of L-selectin expression. *J Allergy Clin Immunol* 1997 Apr;99(4):522-529.

Beyer K, Renz H, Wahn U, Niggemann B. Changes in blood leukocyte distribution during double-blind, placebo-controlled food challenges in children with atopic dermatitis and suspected food allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;116(2):110-115.

Beyer K, Castro R, Birnbaum A, Benkov K, Pittman N, Sampson HA. Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a Th2 cytokine profile. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109(4):707-713.

Bishop JM, Hill DJ, Hosking CS. Natural history of cow milk allergy: clinical outcome. *J Pediatrics* 1990;116:862-867.

Björkstén B, Borres MP, Einarsson R. Interleukin-4, soluble CD23 and interferon-gamma levels in serum during the first 18 months of life. *Int Arch Allergy Immunol* 1995 May-Jun;107(1-3):34-36.

Björkstén B. Allergy priming early in life. *Lancet* 1999;353:167-168.

Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor R, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(4):516-520.

Blanco-Quiros A. Síntesis y modulación de la IgE en el recién nacido. *Allergología et Immuopathologia* 1999;26:84-87.

Bock SA, Sampson HA, Atkins FM, Zeiger RS, Lehrer S, Sachs M, Bush RK, Metcalfe DD. Double-blind placebo controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: a manual. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:986-997.

Bock SA, Sampson HA. Food allergy in infancy. *Pediatr Clin North Am* 1994 Oct;41(5):1047-1067.

Borish L. Updates on cells and cytokines. IL10: Evolving concepts. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:203-207.

Bousoño C. Alergia e intolerancia alimentaria. Principales formas clínicas de presentación. *Bol Pediatr* 1999;39:148-151.

Brandtzaeg P. Mechanisms of gastrointestinal reactions to food. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1997;4:24.

Brarda OA, Vanella LM, Greco CR. Lymphocyte blastogenesis in children with cow's milk hypersensitivity after its elimination from the diet. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1989;17(1):45-48.

Brown AF, McKinnon D, Chu K. Emergency department anaphylaxis: A review of 142 patients a single year. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(5):861-866.



Bruijnzeel-Koomen CAFM, Ortolani C, Aas K. Adverse reactions to foods. Position paper. *Allergy* 1995;50:623-636.

Burks AW, King N, Bannon GA. Modification of a major peanut allergen leads to loss of IgE binding. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:313-314.

Burks W, Bannon G, Lehrer SB. Classic specific immunotherapy and new perspectives in specific immunotherapy for food allergy. *Allergy* 2001;56(Suppl 67):121-124.

Burr ML, Merrett TG, Dunstan FDJ, Maguire MJ. The development of allergy in high-risk children. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1247-1253.

Businco L, Bellanti J. Food allergy in childhood. Hypersensitivity to cow's milk allergens. *Clin Exp Allergy* 1993;23:481-483.

Businco L, Dreborg S, Einarsson R, Giampietro PG, Host A, Keller KM, Strobel S, Wahn U, Björkstén B, Kjellman MN. Hydrolysed cow's milk formulae. Allergenicity and use in treatment and prevention. An ESPACI position paper. *Pediatr Allergy Immunol* 1993;4:101-111.

Businco L, Bruno G, Giampietro PG. Nutrición y alergias alimentarias. En: *Tratado de Nutrición Pediátrica*. Tojo R (ed). Ed. Doyma, Barcelona, 2001. pp 661-672.

Buttriss J. En: *Adverse reactions to food*. Oxford: Blackwell science Ltd, UK. 2002.

Calkhoven PG, Aalbers M, Koshte VL, Schilte PP, Yntema JL, Griffioen RW, Van Nierop JC, Oranje AP, Aalberse RC. Relationship between IgG1 and IgG4 antibodies to foods and the development of IgE antibodies to inhalant allergens. II. Increased levels of IgG antibodies to foods in children who subsequently develop IgE antibodies to inhalant allergens. *Clin Exp Allergy* 1991;21:99-107.

Campbell DE, Hill DJ, Kemp AS. Enhanced IL-4 but normal interferon-gamma production in children with isolated IgE mediated food hypersensitivity. *Pediatr Allergy Immunol* 1998;9(2):68-72.

Carroccio A, Montalto G, Custro N, Notarbartolo A, Cavatio F, D'Amico D, Alabrese D, Iacono G. Evidence of very delayed clinical reactions to cow's milk in cow's milk-intolerant patients. *Allergy* 2000;55(6):574-579.

Casimir GJ, Duchateau J, Gossart B, Cuvelier P, Vandaele F, Vis HL. Atopic dermatitis: role of food and house dust mite allergens. *Pediatrics* 1993 Aug;92(2):252-256.

Casimir G, Cuvelier P, Allard S, Duchateau J. Life-threatening fish allergy successfully treated with immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol* 1997;8(2):103-105.

Chandra RK, Shakuntla P, Hamed A. Influence of maternal diet during lactation and use of formula feeds on development of atopic eczema in high risk infants. *BMJ* 1989;299:228-230.

Chandra RK, Hamed A. Cumulative incidence of atopic disorders in high risk infants fed whey hydrolysate, soy, and conventional cow milk formulas. *Ann Allergy* 1991;67:129-132.

Chandra RK, Gill B, Kumari S. Food allergy and atopic disease: pathogenesis, diagnosis and prediction of high risk and prevention. *Ann Allergy* 1993;71:495-502.

Chandra RK. Food hypersensitivity and allergic disease: a selective review. *Am J Clin Nutr* 1997;66:526-529.

Chandra RK. Food allergy. *Indian J Pediatr* 2002;69(3):251-255.

Chatchatec P, Jarvinen KJ, Bardina L, Beyer K, Sampson H. Identification of IgE and IgG-binding epitopes on alpha-casein: Differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:379-383.

Chen KS, Miller KH, Hengehold D. Diminution of T cells with gamma delta receptor in the peripheral blood of allergic asthmatic individuals. *Clin Exp Allergy* 1996 Mar;26(3):295-302.

Chen R, Lowe L, Wilson JD, Crowther E, Tzeggai K, Bishop JE, Varro R. Simultaneous quantification of six human cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. *Clin Chem* 1999;9:1693-1694.

Chlumsky , Pokorna H. Relation between clinical severity of bronchial asthma and degree of airway inflammation assessed by the eosinophilic leukocyte count in induced sputum. *Vnitr Lek* 2001; 47(9):604-608.

Christie L, Hine RJ, Parker JG, Burks W. Food allergies in children affect nutrient intake and growth. *J Am Diet Assoc* 2002 Nov;102(11):1648-1651.

Cohen M, Splansky G, Gallagher J, Bernstein D, Bernstein Y. Epidemiologic survey and validation of adverse food reactions in adult populations. *J Allergy Clin Immunol* 1985;75:206.

Cohn L, Tepper JS, Bottomly K. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *J Immunol* 1998 Oct 15;161(8):3813-3816.

Cook EB, Stahl JL, Lowe L, Chen R, Morgan E, Wilson J, Varro R, Chan A, Graziano FM, Barney NP. Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs. non-allergics. *J Immunol Methods* 2001;254:109-118.

Corrigan CJ, Haczku A, Gemou-Engesaeth V, Doi S, Kikuchi Y, Takatsu K, Durham SR, Kay AB. CD4 T-lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin-5. Effect of glucocorticoid therapy. *Am Rev Respir Dis* 1993 Mar;147(3):540-547.

Crespo JF, Pascual C, Burks AW, Helm RM, Esteban MM. Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. *Pediatr Allergy Immunol* 1995 Feb;6(1):39-43.

Croner S, Kjellman N. Development of atopic disease in relation to family history and cord blood IgE levels. Eleven-year follow-up in 1654 children. *Pediatr Allergy Immunol* 1990;1:14-20.

Cross ML, Stevensen LM, Gill HS. Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int Immunopharmacol* 2001;1:891-901.

Dannaeus A. Age-related antibody response to food antigens. *Pediatr Allergy Immunol* 1993; 4(Suppl 3):21-24.

Dandrifosse G, Peulen O, El Khefif N, Deloyer P, Dandrifosse AC, Grandfils C. Are milk polyamines preventive agents against food allergy?. *Proc Nutr Soc* 2000 Feb;59(1):81-86.

David TJ, Patel L, Ewing CI. Diagnosis and management. En: *Encyclopedia of Human Nutrition*, Ed: Sandler MJ, Strain JJ, Caballero B. Academic Press, London. ISBN 012 226694-3, pp836-843.

De Amici M, Puggioni F, Casali L, Alesina R. Variations in serum levels of interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-6, and tumor necrosis factor-alpha during specific immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86(3):311-313.

De Jong EC, Spanhaak S, Martens BP, Kapsenberg ML, Penninks AH, Wierenga EA. Food allergen (peanut)-specific TH2 clones generated from the peripheral blood of a patient with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1996 Jul;98(1):73-81.

De Libero G. Tissue distribution, antigen specificity and effector functions of gamma delta T cells in human diseases. *Springer Semin Immunopathol* 2000;22(3):219-238.

Duchateau J, Michils A, Lambert J, Gossart B, Casimir G. Anti-betalactoglobulin IgG antibodies bind to a specific profile of epitopes when patients are allergic to cow's milk proteins. *Clin Exp Allergy* 1998 Jul;28(7):824-833.

Deniz G, Akdis M, Aktas E, Blaser K, Akdis C. Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN- $\gamma$ -nonsecreting NK cells. *Eur J Immunol* 2002;32:879-884.

Devereux G, Seaton A, Barker RN. In utero priming of allergen-specific helper T cells. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1686-1695.

Diez-Gómez ML, Quirce S, Cuevas M, Sanchez-Fernandez C, Baz G, Moradiellos FJ, Martinez A. Fruit-pollen-latex cross-reactivity: implication of profilin (Bet v 2). *Allergy* 1999 Sep;54(9):951-961.

Docena GH, Fernández R, Chirido FG, Fossati CA. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 1996;51:412-416.

Dohi M, Suko M, Sugiyama H, Yamashita N, Tadokoro K, Juji F, Okudaira H, Sano Y, Ito K, Miyamoto T. Food-dependent, exercise-induced anaphylaxis: a study on 11 Japanese cases. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87(1 Pt 1):34-40.

Dorion BJ, Leung DY. Selective expansion of T cells expressing V beta 2 in peanut allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 1995 May;6(2):95-97.

Dreborg S. Diagnosis of food allergy: tests in vivo and in vitro. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12 Suppl 14:24-30.

Eggesbo M, Botten G, Halvorsen R, Magnus P. The prevalence of CMA/CMPI in young children: the validity of parentally perceived reactions in a population-based study. *Allergy* 2001 May;56(5):393-402.

Eigenmann PA, Belli DC, Ludi F, Kahn JM, Polla BS. In vitro lymphocyte proliferation with milk and a casein-whey protein hydrolyzed formula in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1995 Oct;96(4):549-557.

Eigenmann PA, Zamora SA, Belli DC. Alergias alimentarias. *Anales Nestlé* 1999;57:60-71.

ESPGAN Committee on nutrition. Comment on antigen-reduced infant formulae. *Acta Paediatr* 1993;82:314-319.

Esteban S, García Martínez-Bartolomé R, Pérez Rodríguez O, Maluendo Carrillo C. Intolerancia a las proteínas de leche de vaca. *Pediatría* 2000;122:100-113.

Eysink PED, Bindels PJE, Stapel SO, Bottema BJ, Van Der Zee, Aalberse RC. Do levels of immunoglobulin G antibodies to foods predict the development of immunoglobulin E antibodies to cat, dog and/or mite? *Clin Exp Allergy* 2002;32:556-562.

Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon- and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by  $\gamma\delta$  T cells in vivo. *Nature* 1995;373: 255-257.

Fox PF. *Developments in dairy chemistry. 1. Proteins.* London: Applied Science Publishers, 1982.

Freeman J. "Rush" inoculation, with a special reference to hay fever treatment. *Lancet* 1930;744-747.

Fukutomi O, Kondo N, Agata H, Shinoda S, Kuwabara N, Shinbara M, Orii T. Timing of onset of allergic symptoms as a response to a double-blind, placebo-controlled food challenge in patients with food allergy combined with a radioallergosorbent test and the evaluation of proliferative lymphocyte responses. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;194(4):352-357.

Fuleihan RL. Allergy, immunology, and related disorders. *Curr Opin Pediatr* 1998;10:581-583.

García-Ara MC, Boyuno T, Martín Esteban M, Martín Muñoz, Ojeda Casas JM. Actitud terapéutica y pronóstico en la alergia a alimentos. *Allergol et Immunopathol* 1996;24:31-35.

Geha RS. Atopic allergy and other hypersensitivities. Allergy, a disease of the internal and external environments. *Curr Opin Immunol* 2000;12(6):615-617.

Gemou-Engesaeth V, Kay AB, Bush A, Corrigan CJ. Activated peripheral blood CD4 and CD8 T-lymphocytes in child asthma: correlation with eosinophilia and disease severity. *Pediatr Allergy Immunol* 1994 Aug;5(3):170-177.

Giampietro PG, Kjellman NIM, Oldaeus G, Wouters-Wesseling W, Businco L. Hypoallergenicity of an extensively hydrolyzed whey formula. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12:83-86.

Goldman AS, Sellars WA, Halpern SR. Milk Allergy II Skin testing of allergic and normal children with purified milk proteins. *Pediatrics* 1963;32:672-679.

Gordon RR, Noble DA, Ward AM, Allen R. Immunoglobulin E and the eczema-asthma syndrome in early childhood. *Lancet* 1982 Jan 9;1(8263):72-74.

Gray JD, Horwitz DA. Activated human NK cells can stimulate resting B cells to secrete immunoglobulin. *J Immunol* 1995;154:5656-5664.

Gruber C, Kulig M, Guggenmoos-Holzmann I. Total IgE, specific sensitization, and atopic disease in BCG-vaccinated and non-vaccinated children. *Allergy Clin Immunol Int* 1997;Suppl 4:97.

Hagendorens MM, Van Bever HP, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Bridts CH, Stevens WJ. Determination of T-cell subpopulations and intracellular cytokine production (interleukin-2, interleukin-4, and interferon-gamma) by cord blood T-lymphocytes of neonates from atopic and non-atopic parents. *Pediatr Allergy Immunol* 2000 Feb;11(1):12-19.

Hanson LA, Silfverdal SA, Strömbäck L, Erling V, Zaman S, Olcén P, Telemo E. The immunological role of breast feeding. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12(Suppl 14):15-19.

Harmanci E, Gulbas Z, Ozdemir N, Elbek O, Isik R. Lymphocyte subtypes in asthma: relationship with the clinical status and bronchial hyperreactivity. *Allerg Immunol (Paris)* 1998 Oct;30(8):245-248.

Hattevig G, Sigurs N, Kjellman B. Maternal food avoidance during lactation and allergy during the first 10 years of age. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:241.

Hattevig G, Sigurs N, Kjellman B. Effects of maternal dietary avoidance during lactation on allergy in children at 10 years of age. *Acta Paediatr* 1999;88:7-12.

Hauer AC, Breese EJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. The frequency of cells secreting interferon-gamma and interleukin-4, -5, and -10 in the blood and duodenal mucosa of children with cow's milk hypersensitivity. *Pediatr Res* 1997 Nov;42(5):629-638.

Hayday AC, Robert S, Ramsburt E. Gammadelta cells and the regulation of mucosal immune responses. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(4 Suppl. 2):161-163.

Heiner DC, Sears JW, Kniker WT. Multiple precipitins to cow's milk in chronic respiratory disease. A syndrome including poor growth, gastrointestinal symptoms, evidence of allergy, iron deficiency anemia, and pulmonary hemosiderosis. *Am J Dis Child* 1962;103:634-654.

Helm RM, Burks AW. Mechanisms of food allergy. *Curr Opin Immunol* 2000;12:647-653.

Henriksen C, Eggesbo M, Halvorsen R, Botten G. Nutrient intake among two-year-old children on cows' milk-restricted diets. *Acta Paediatr* 2000 Mar;89(3):272-278.

Hernández M, Sastre A. Tablas de crecimiento. En: *Tratado de Nutrición*. Madrid. Díaz de Santos. 1999; 1415-1430.



Hershberg RM, Mayer LF. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cell-polarity and complexity. *Immunology Today* 2000;21:123-128.

Higgins JA, Lamb JR, Lake RA, O'Hehir RE. Polyclonal and clonal analysis of human CD4+ T-lymphocyte responses to nut extracts. *Immunology* 1995 Jan;84(1):91-97.

Hill DJ, Firer MA, Ball G, Hosking CS. Natural history of cow's milk allergy in children: immunological outcome over 2 years. *Clin Exp Allergy* 1993;121:371-377.

Hill DJ, Hosking CS, Reyes-Benito LV. Reducing the need for food allergen challenges in young children: a comparison of in vitro with in vivo tests. *Clin Exp Allergy* 2001 Jul;31(7):1031-1035.

Hoffman DR. Food allergy in children: RAST studies with milk and egg. In: Evans RI., ed. *Advances in Diagnosis of Allergy: RAST*. New York: Stratton, 1975:165-169.

Hoffman KM, Ho DG, Sampson HA. Evaluation of the usefulness of lymphocyte proliferation assays in the diagnosis of allergy to cow's milk. *J Allergy Clin Immunol* 1997 Mar;99(3):360-366.

Hosking CS, Heine RG, Hill DJ. The Melbourne milk allergy study - two decades of clinical research. *ACI International* 2000;12(5):198-205.

Host A, Halken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy* 1990; 45(8):587-596.

Host A, Husby S, Gjesing B, Larsen JN, Lowenstein H. Prospective estimation of IgG, IgG subclass and IgE antibodies to dietary proteins in infants with cow milk allergy. Levels of antibodies to whole milk protein, BLG and ovalbumin in relation to repeated milk challenge and clinical course of cow milk allergy. *Allergy* 1992 Jun;47(3):218-229.

Host A. Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy: some clinical, epidemiological and immunological aspects. *Pediatr Allergy Immunol* 1994;5:5-36.

Host A, Jacobsen HP, Halken S, Holmenlund D. The natural history of cow's milk protein allergy/intolerance. *Eur J Clin Nutr* 1995;49(Suppl):S13-S18.

Host A, Halken S, Jacobsen HP, Estmann A, Mortensen S, Mygil S. The natural course of cow's milk protein allergy/intolerance. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:490:1988.

Host A. Clinical course of cow's milk protein allergy and intolerance. *Pediatr Allergy Immunol* 1998;9(Suppl 11):48-52.

Host A. Primary and secondary dietary prevention. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12 Suppl 14:78-84.

Hourihane J O'B, Kilburn SA, Dean TP, Warner JO. Clinical characteristics of peanut allergy. *Clin Exp Allergy* 1997;27:634-639.

Hourihane J O'B, Dean TP, Warner JO. Peanut allergic subjects' peripheral blood mononuclear cell proliferative responses to crude peanut protein. *Clin Exp Allergy* 1998;28:163-168.

Isolauri E, Rautava S, Kalliomaki M, Kirjavainen P, Salminen S. Role of probiotics in food hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002 Jun;2(3):263-271.

Isolauri E, Sutas Y, Makinen-Kijunen S, Oja SS, Isosomppi R, Turjanmaa K. Efficacy and safety of hydrolyzed cow milk and amino acid-derived formulas in infants with cow milk allergy. *J Pediatr* 1995;127:550-557.

Isolauri E, Turjanmaa K. Combined skin prick and patch testing enhances identification of food allergy in infants with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:9-15.

Ivady G, Torma I, Baranyai P, Jezerniczki J, Madarasz J, Bitvai K. Iron deficiency anemia caused by occult intestinal bleeding due to milk allergy. *Monatsschr Kinderheilkd* 1987;126(10):627-630.

James JM, Sampson HA. Immunologic changes associated with the development of tolerance in children with cow milk allergy. *J Pediatr* 1992 Sep;121(3):371-377.

Jansen J, Kardinaal A, Huijbers G, Vlieg-Berstra J, Martnes B, Ockhuizen T. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:446-456.

Järvinen KM, Aro A, Juntunen-Backman K, Suomalainen H. Large number of CD19+/CD23+ B cells and small number of CD8+ T cells as early markers for cow's milk allergy (CMA). *Pediatr Allergy Immunol* 1998;9:139-142.

Jarvinen KM, Beyer K, Vila L, Chatchatec P, Busse PJ, Sampson HA. B cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110(2):293-297.

Jenmalm MC, Björkstén B. Cord blood levels of immunoglobulin G subclass antibodies to food and inhalant allergens in relation to maternal atopy and the development of atopic disease during the first 8 years of life. *Clin Exp Allergy* 2000;30(1):34-40.

Jenmalm MC, Björkstén B. Development of immunoglobulin G subclass antibodies to ovalbumin, birch and cat during the first eight years of life in atopic and non-atopic children. *Pediatr Allergy Immunol* 1999;10:112-121.

Just J, Fournier L, Momas I, Zambetti C, Sahraoui F, Grimfeld A. Clinical significance of bronchoalveolar eosinophils in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110(1):42-44.

Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001;357:1076-1079.

Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Flabbee J, Beaudouin E, Morisset M, Thevenin M. Population study of food allergy in France. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(1):133-140.

Katsunuma T, Iikura Y, Akasawa A, Iwasaki A, Hashimoto K, Akimoto K. Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis: inhibition by sodium bicarbonate. *Ann Allergy* 1992 Feb;68(2):184-188.

Katz AJ, Twarog FJ, Zeiger RS, Falchuk ZM. Milk-sensitive and eosinophilic gastroenteropathy: similar clinical features with contrasting mechanisms and clinical course. *J Allergy Clin Immunol* 1984;74:72-78.

Kazemi-Shirazi L, Pauli G, Purohit a Spitzauer S, Fr]oschl R, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H, Scheiner O, Kraft D, Valenta R. Quantitative IgE inhibition experiments with purified recombinant allergens indicate pollen-derived allergens as the sensitizing agents responsible for many forms of plant food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:116-125.

Keller KM, Burgin-Wolff A, Lippold R, Lentze MJ. Quality assurance in diagnostics: are there normal values for IgG-antibodies to cow's milk proteins?. *Klin Padiatr* 1999 Sep-Oct;211(5):384-388.

Kelso JM, Jones RT, Tellez R, Yunginger JW. Oral allergy syndrome successfully treated with pollen immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;74(5):391-396.

Kenyon NJ, Kelly EAB, Jarjour NN. Enhanced cytokine generation by peripheral blood mononuclear cells in allergic and asthma subjects. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85(2):115.

Kitts D, Yuan Y, Joneja J, Scott F, Szilagyi A, Amiot J, Zarkadas M. Adverse reactions to food constituents: allergy, intolerance and autoimmunity. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75:241-254.

Kjellman NI, Johansson SG. Soy versus cow's milk in infants with a biparental history of atopic disease: development of atopic disease and immunoglobulins from birth to 4 years of age. *Clin Allergy* 1979 Jul;9(4):347-358.

Kjellman NI, Nilson L. Is allergy prevention realistic and beneficial?. *Pediatr Allergy Immunol* 1999;10(Suppl 12):11-17.

Klemola T, Vanto J, Juntunen-Backman K, Kalimo K, Korpela R, Varjonen E. Allergy to soy formula and to extensively hydrolyzed whey formula in infants with cow's milk allergy: a prospective, randomized study with a follow-up to the age of 2 years. *J Pediatr* 2002;140:219-224.

Kokkonen J, Simila S, Herava R. Impaired gastric function in children with cow's milk intolerance. *Eur J Pediatr* 1979;132:1-6.

Kokkonen J, Holm K, Karttunen TJ, Maki M. Children with untreated food allergy express a relative increment in the density of duodenal gammadelta+ T cells. *Scand J Gastroenterol* 2000 Nov;35(11):1137-1142.

Kokkonen J, Tikkanen S, Karttunen TJ, Savilahti E. A similar high level of immunoglobulin A and immunoglobulin G class milk antibodies and increment of local lymphoid tissue on the duodenal mucosa in subjects with cow's milk allergy and recurrent abdominal pains. *Pediatr Allergy Immunol* 2002 Apr;13(2):129-136.

Kondo N, Agata H, Fukutomi O, Motoyoshi F, Orii T. Lymphocyte responses to food antigens in patients with atopic dermatitis who are sensitive to foods. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86(2):253-260.

Koning H, Baert MRM, Oranje AP, Savelkoul HFJ, Neijens HJ. Development of immune functions related to allergic mechanisms in young children. *Pediatr Research* 1996;40(3):363-375.

Koning H, Neijens HJ, Baert MR, Oranje AP, Savelkoul HF. T cells subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. II. Analysis and IL-5 and IL-10 mRNA expression and protein production. *Cytokine* 1997;9(6):427-436.

Korol D, Kaczmarski M. Positive family history of allergy in children with hypersensitivity to cow's milk. *Med Sci Monit* 2001 Sep-Oct;7(5):966-970.

Krejsek J, Kral B, Vokurkova D, Derner V, Touskova M, Parakova Z, Kopecky O. Decreased peripheral blood gamma delta T cells in patients with bronchial asthma. *Allergy* 1998;53(1):73-77.

Kurup VP, Fink JN. The spectrum of immunologic sensitization in latex allergy. *Allergy* 2001;52(1):2-9.

Laan MP, Tibbe GJ, Oranje AP, Bosmans EP, Neijens HJ, Savelkoul HF. CD4+ cells proliferate after peanut-extract-specific and CD8+ cells proliferate after polyclonal stimulation of PBMC of children with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 1998 Jan;28(1):35-44.

Lasley MW. Allergic disease prevention and risk factor identification. *Imm Allergy Clin Nort Am* 1999;19:149-159.

Lebrero E, Fernández Moya L, Somoza Álvarez ML. Alergia a alimentos en niños. *Allergol Immunol Clin* 2001;16(2):96-115.

Leung DYM. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:860-876.

Lewis SA, Britton JR. Measles infection, measles vaccination and the effect of birth order in the aetiology of hay fever. *Clin Exp Allergy* 1998;28:1493-1500.

Lin RY, Barnard M. Skin testing with food, codeine, and histamine in exercise-induced anaphylaxis. *Ann Allergy* 1993 Jun;70(6):475-478.

Lore K, Sonnerborg A, Spetz AL, Andersson U, Andersson. Immunocytochemical detection of cytokines and chemokines in Langerhans cells and in vitro derived dendritic cells. *J Immunol Methods* 1998 May 1;214(1-2):97-111.

Lorente F, Laffond E, Dávila I, Moreno E. Mecanismos de tolerancia inmunológica. Prevención primaria de la alergia a alimentos. *Alergol Inmunol Clin* 2001;16(2):58-75.

Lorente F, Lozano MJ. Mesa Redonda: Alergia e intolerancia alimentaria. Intervenciones profilácticas. *Bol Pediatr* 1999;39:164-171.

Lorente F, Romo A, Laffod E, Dávila E. Medidas de prevención de las enfermedades alérgicas. *Allergologia et Immunopathologia* 1998;26:97-109.

Lorentz A, Schwengberg S, Mierke C, Manns MP, Bischoff SC. Human intestinal mast cells produce IL-5 in vitro upon IgE receptor cross-linking and in vivo in the course of intestinal inflammatory disease. *Eur J Immunol* 1999 May;29(5):1496-1503.

Loza MJ, Peters SP, Zangrilli JG, Perussia B. Distinction between IL-13+ and IFN-gamma+ natural killer cells and regulation of their pool size by IL-4. *Eur J Immunol* 2002 Feb;32(2):413-423.

Lugovic L, Lipozenic J, Jakic-Razumovic J. Atopic dermatitis: immunophenotyping of inflammatory cells in skin lesions. *Int J Dermatol* 2001;40(8):489-494.

Macdougall EF, Cant AJ, Colver AF. How dangerous is food allergy in childhood? The incidence of severe and fatal allergic reactions across the UK and Ireland. *Arch Dis Child* 2002;86(4):236-239.

Machida HM, Catto Smith AG, Gall DG, Trevenen C, Scott RB. Allergic colitis in infancy: clinical and pathologic aspects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994;142(Suppl. 3):17-19.

Majamaa H, Isolauri E: Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:179-185.

Mak TW y Ferrick DA. The  $\gamma\delta$  T-cell bridge: Linking innate and acquired immunity. *Nature Medicine* 1998;4(7):764-765.

Malinowska E, Kaczmarek M, Wasilewska J. Total IgE levels and skin test results in children under three years of age with food hypersensitivity. *Med Sci Monit* 2002;8(4):280-287.

Marcos A, Toro O, Varela P, Nova E, López-Vidriero I, Requejo A, Morandé G. Nutritional therapy in anorexia nervosa: Immunomodulator effect of yoghurt. *J Adolescent Health* 1996;18 (2):157-162.

Marcos A, Varela P, Toro O, López-Vidriero I, Nova E, Madruga D, Casas J, Morandé G. Interactions between nutrition and immunity in anorexia nervosa: a 1-y follow-up study. *Am J Clin Nutr* 1997;66(Suppl):485-490.

Marini A, Agosti M, Motta G, Mosca F. Effect of dietary and environmental Prevention programme on the incidence of allergic symptoms in high atopic risk infants: three years follow-up. *Acta Paed* 1996;414:1-22.

Martín Esteban M. Alergia a las proteínas de la leche de vaca en el lactante. Sesiones interhospitalarias de la Sociedad Madrid-Castilla la Mancha de Alergología e Inmunología Clínica. Madrid: Luzán, 1993;333-350.

Martín M, Pascual C. Intolerancia a alimentos y aditivos. En: Tratado de Nutrición Pediátrica. Tojo R (ed). Ed. Doyma, Barcelona, 2001. pp 673-684.

Martínez Gimeno A, Del Castillo P, García Hernández G, Luna Paredes C, García Sánchez JA, Nogales Espert A. Prevalence of food allergy/intolerance in children: results from a population based survey. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:S130.



Matricardi PM, Rosmini F, Rapicetta M, Gasbarrini G, Strofolini T. Atopy, hygiene and anthropometric lifestyle. *Lancet* 1999;354:430.

Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M, et al. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *Br Med J* 2000;320:412-417.

Matsumoto T, Goto Y, Miike T. Markedly high eosinophilia and an elevated serum IL-5 level in an infant with cow milk allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999 Mar;82(3):253-256.

Mattsby-Baltzer I, Roseanu A, Motas C, Elverfors J, Engberg I, Hanson LA. Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocyte cells. *Pediatr Res* 1996;40:257-262.

Mc Keever TM, Lewis SA, Smith C, Collins J, Heathlie, Frisher M Hubbard R. Siblings, multiple births, and the incidence of allergic disease: A birth cohort study using the West Midlands General Practice Research Database. *Thorax* 2001;56:758-762.

Mc Keever TM, Lewis SA, Smith C, Collins J, Heatlie H, Frischer M, Hubbard R. Early exposure to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: A birth cohort study with the West Midlands General Practice Research Dantabase. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109(1):43-50.

Mc Menamin C, Pimm C, McKersey M, Holt PG. Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific  $\gamma\delta$  T cells. *Science* 1994;265:1869-1871.

Molfino NA, Doherty PJ, Suurmann IL y col. Analysis of the T cell receptor V gamma region gene repertoire in bronchoalveolar lavage (BAL) and peripheral blood of atopic asthmatic and healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 1996;104:144-153.

Moneret-Vautrin DA, Sainte-Laudy J, Danny G, Fremont S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;82(1):33-40.

Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A. Natural killer cells: a mystery no more. *Scand J Immunol* 2002;55(3):229-232.

Moverare R, Elfman L, Stalenheim G, Bjornsson E. Study of the Th1/Th2 balance, including IL-10 production in cultures of peripheral blood mononuclear cells from birch-pollen-allergic patients. *Allergy* 2000;55(2):171.

Muraro MA. Diagnosis of food allergy: the oral provocation test. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12 Suppl 14:31-36.

Nelson HS, Lahr J, Rule R, Bock SA, Leung DYM. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:744-751.

Ng TW, Holt PG, Prescott SL. Cellular immune responses to ovalbumin and house dust mite in egg-allergic children. *Allergy* 2002;57(3):207-214.

Nieto García A. Nuevas perspectivas en el tratamiento de la alergia a alimentos. Inmunoterapia específica con los alimentos y otras alternativas. *Alergol Inmunol Clin* 2001;16(2):158-168.

Niggemann B, Reibel S, Wahn U. The atopy patch test (APT) -a useful tool for the diagnosis of food allergy in children with atopic dermatitis. *Allergy* 2000;55:281-285.

Niggemann B, Reibel S, Roehr CC, Felger D, Ziegert M, Sommerfeld C, Wahn U. Predictors of positive food challenge outcome in non-IgE-mediated reactions to food in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(6):1053-1058.

Niwa Y, Akamatsu H, Sumi H, Ozaki Y, Abe A. Evidence for degradation of cytokines in the serum of patients with atopic dermatitis by calcium-dependent protease. *Arch Dermatol Res* 2000 Aug;292(8):391-396.

Novembre E, Cianferoni A, Bernardini R, Mugnaini L, Caffarelli C, Cavagni G, Giovane A, Vierucci A. Anaphylaxis in children: clinical and allergologic features. *Pediatrics* 1998;101(4):8.

Novembre E, Vierucci A. Milk allergy/intolerance and atopic dermatitis in infancy and childhood. *Allergy* 2001;56 Suppl 67:105-108.

Novoy HS, Fairsheter RD, Salness K, Simon RA, Curd JG. Postprandial exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1984;71:498-504.

Nucera E, Schiavino D, D'Ambrosio C, Stabile A, Rumi C, Gasbarrani G, Patriarca G. Immunological aspects of oral desensitization in food allergy. *Dig Dis Sci* 2000;45:637-641.

Oettgen HC. Regulation of the IgE isotype switch: new insights on cytokine signal and the functions of E germline transcripts. *Curr Opin Immunol* 2000;12:618-623.

Okuma M. Sequential changes of specific IgE, IgG4 antibodies and the development of allergic diseases in the first year of life. *Arerugi* 1992 Mar;41(3):402-410.

Oppenheimer JJ, Nelson HS, Bock SA, Christensen F, Leung DYM. Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:256-262.

Ortaldo JR, Mason A, Overton R. Lymphokine-activated killer cells (LAK): analysis of progenitors, and effectors. *L Exp Med* 1986;164:1193-1205.

Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, Bigi A, Ansaloni R. The oral allergy syndrome. *Ann Allergy* 1988;61:47-52.

Ortolani C, Vighi G. Definition of adverse reactions to food. *Allergy* 1995;50:8-13.

Osterlund P, Jarvinen KM, Laine S, Suomalainen H. Defective tumor necrosis factor-alpha production in infants with cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 1999 Aug;10(3):186-190.

Paganus A, Juntunen-Backman K, Savilahti E. Follow-up of nutritional status and dietary survey in children with cow's milk allergy. *Acta Paediatr* 1992;81(6-7):518-521.

Pascual CY, Crespo JF, Perez PG, Esteban MM. Food allergy and intolerance in children and adolescents, an update. *Eur J Clin Nutr* 2000;54(1):75-78.

Patane R, Bottaro G, Meli C, Failla P, Cagnina M, Torrisi G, Castiglione N, Pennisi P. Megaloblastic anemia: a unusual complication in an infant with double allergy to both cow's milk protein and soy. *Pediatr Med Chir* 1992;14(1):87-91.

Patriarca G, Schiavino D, Nucera E, Schinco G, Milani A, Gasbarrini GB. Food allergy in children: results of a standardized protocol of oral desensitization. *Hepatogastroenterology* 1998;45:52-58.

Patrizi A, Guerrini V, Ricci G, Neri Y, Specchia F, Masi M. The natural history of sensitizations to food and aeroallergens in atopic dermatitis: a 4-year follow-Up. *Pediatr Dermatol* 2000;17(4):261-265.

Pawankar R, Okuda M, Suzuki K, Okumura K, Ra C. Phenotypic and molecular characteristics of nasal mucosa  $\gamma\delta$ -T cells in allergic and infectious rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1655-1665.

Pawankar R.  $\gamma\delta$ -T cells in allergic airway disease. *Clin Exp Allergy* 2000;30:318-323.

Pérez AJ, Fernández B, Santaolalla M, de Paz S, Domínguez AR. Síndrome de anafilaxia inducida por ejercicio. *An Med Interna (Madrid)* 2001;18(5):269-273.

Piccini MP, Beloni L, Claudia LV, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S. Production of leukemia inhibitory factor (LIF) by T cells associates with type 2 T helper (Th2) cytokines.

Defective production of both by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 1998;4:1020.

Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C. Progesterone favors the development of human T helper (Th) cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 clones. *J Immunol* 1995;155:128.

Piccinni MP, Beloni L, Giannarini L, Livi C, Scarselli G, Romagnani S, Maggi E. Abnormal production of T helper 2 cytokines interleukin-4 and interleukin-5 by T cells from newborns with atopic parents. *Eur J Immunol* 1996 Oct;26(10):2293-2298.

Plaza AM, Martin MA, Giner MT, Sierra JJ. Challenge testing in children with allergy to cow's milk proteins. *Allergol Immunol (Madr)* 2001;29(2):50-54.

Prausnitz C, Kustner H. Studies on hypersensitivity. *Centrbl Bakteriol* 1921;86:160-169.

Prescott SL; Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Loh R, Holt PG. Reciprocal age-related patterns of allergen specific T-cell immunity in normal versus atopic infants. *Clin Exp Allergy* 1998;28:30-44.

Pumphrey RSH, Stanworth SJ. Clinical spectrum of anaphylaxis in north-west England. *Clin Exp Allergy* 1996;26:1364-1370.

Rance R, Dutau G. Labial food challenge in children with food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 1997;8(1):41-44.

Rasanen M, Laitinen T, Kaprio J. Hay fever, asthma and number of older sibling: a twin study. *Clin Exp Allergy* 1997;27:515-518.

Rautava S, Kalliomäki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109(1):119-121.

Reekers R, Beyer K, Niggemann B, Wahn U, Freiherst J, Kapp A, Werfel T. The role of circulating food antigen-specific lymphocytes in food allergic children with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1996 Dec;135(6):935-941.

Ring J, Vieluf D. Adverse reactions to food. *Curr Probl Dermatol* 1991;20:187-202.

Roehr CC, Reibel S, Ziegert M, Sommerfeld C, Wahn U, Niggemann B. Atopy patch tests, together with determination of specific IgE levels, reduce the need for oral food challenges in children with atopic dermatitis.. *J Allergy Clin Immunol* 2001 Mar;107(3):548-553.

Roitt I, Brostoff J, Male D (eds). *Inmunología*. Harcourt Brace Publishers International, 2001.

Rueda Esteban S, García Martínez R, Pérez Rodríguez O, Maluenda Carrillo C. Intolerancia a las proteínas de leche de vaca. *Pediatría* 2000;122:100-113.

Saarinen UM, Juntunen K, Kajosaari M, Bjorksten F. Serum immunoglobulin E in atopic and non-atopic children aged 6 months to 5 years. A follow-up study. *Acta Paediatr Scand* 1982 May;71(3):489-494.

Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182:389-400.

Samartín S, Marcos A, Chandra RK. Food hypersensitivity. *Nutr Res* 2001;21:473-497.

Samartín S, Marcos A, Nogales A. Probióticos y alergia alimentaria. En: *Alimentos funcionales. Probióticos*. Madrid: Médica Panamericana, 2002;121-130.

Samsøe-Jensen T, Hauge-Kristensen K. In vitro fixation of skin-sensitization and antibodies to skin cells mesenchymal tissue. *Acta Allergol* 1960;15: 202-207.

Sampson HA, Albergo R. Comparison of results of skin tests, RAST, and double-blind, placebo-controlled food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1984 Jul;74(1):26-33.

Sampson HA, Ho DG. Utility of the CAP FEIA (CAP) in diagnosing IgE-mediated food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95(1):329.

Sampson HA, Ho DG. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:444-451.

Sampson HA. Fatal food-induced anaphylaxis. *Allergy* 1998;53:125-130.

Sampson HA. Food anaphylaxis. *Br Med Bull* 2000;56(4):925-935.

Sampson HA. Food allergy: immunology of the GI mucosa towards classification and understanding of the GI hypersensitivities. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12(14):7-9.

Sampson HA. Immunological approaches to the treatment of food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12(Suppl 14):91-96.

Sanz ML. Inmunidad del tracto intestinal. Procesamiento de antígenos. *Allergol Inmunol Clin* 2001;16(2):58-75.

Savilahti E, Kuitunen M. Allergenicity of cow milk proteins. *J Pediatr* 1992;121(Suppl):12-20.

Schäfer T, Böhler E, Ruhdorfer S, Weigl L, Wessner D, Heinrich J, Filipiak B, Wichmann HE, Ring J. Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy. *Allergy* 2001; 56:1172-1179.

Shahabuddin S, Al-Ayed I, Gad El-Rab MO, Qureshi MI. Age-related changes in blood lymphocyte subsets of Saudi Arabian healthy children. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5(5):632-635.

Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW, Goudiaby A. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 1996;347:1792-1796.

Schauer U, Dippel E, Gieler U, Brauer J, Jung T, Heymanns J, Rieger CH. T cell receptor gamma delta bearing cells are decreased in the peripheral blood of patients with atopic diseases. *Clin Exp Immunol* 1991;86:440-443.

Scheinmann P, Gendrel D, Charlas J, Paupe J. Value of lymphoblast transformation test in cow's milk protein intestinal intolerance. *Clin Allergy* 1976;6:515-521.

Sepp E, Julge K, Vasar M, Naaber P, Bjorksten B, Mikelsaar M. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr* 1997;86(9):956-961.

Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu T, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorders. *Science* 1997;275:77-79.

Sicherer S, Muñoz Furong A, Burks A, Sampson H. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial telephone survey. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:559-562.

Sicherer SH, Sampson HA. Cow's milk protein-specific IgE concentrations in two age groups of milk-allergic children and in children achieving clinical tolerance. *Clin Exp Allergy* 1999;29:507-512.

Sicherer SH, Noone SA, Koerner CB, Christie L, Burks AW, Sampson HA. Hypoallergenicity and efficacy of an amino acid-based formula in children with cow's milk and multiple food hypersensitivities. *J Pediatr* 2001;138:688-693.



Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1501-1507.

Simecka JW. Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance. *Advanced Drug delivery Reviews* 1998;34:235-259.

Simila S, Lanning M, Kokkonen J. Thrombocytopenia in allergic protein-losing gastroenteropathy. Report of an infant with Down's syndrome. *Pediatr Padol* 1981;16(3):373-376.

Smart JM, Kemp AS. Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease. *Clin Exp Allergy* 2002 May;32(5):796-802.

Solís-Pereyra B, Lemonnier D. Induction of 2'-5' A synthetase activity and interferon in humans by bacteria used in dairy products. *Eur Cytokine Netw* 1991;2:137-140.

Solís-Pereyra B, Nova E, Gómez S, Samartín S, Mouane N, Lemtouni A, Belaoui H, Marcos A. The effect of fermented milk on interferon production in malnourished children and in anorexia nervosa patients undergoing nutritional care. *Eur J Clin Nutr* 2002 Dec;56 (Suppl 4):27-33.

Solís-Pereyra D, Aattouri N, Lemonnier D. Role of food in the stimulation of cytokine production. *Am J Clin Nutr* 1997;66(Suppl):521-525.

Song Z, Casolaro V, Chen R, Georas SN, Monos D, Ono SJ. Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene. *J Immunol* 1996 Jan 15;156(2):424-429.

Sorensen RU, Porch MC. Allergy and Infection. Ed, Suskind and Tontisirin D. Nestlé Nutrition Workshop Series, Pediatric Program, Vol. 45. Nestec Ltd., Vevey/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2001,45:263-279.

Sporik R, Hill DJ, Hosking CS. Specificity of allergen skin testing in predicting positive open challenges in children. *Clin Exp Allergy* 2000; 1540-1546.

Sprickelman AB, Heymans HSA, Van Aalderen WMC. Development of allergic disorders in children with cow's milk allergy or intolerance in infancy. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1358-1363.

Stanley JS, King N, Burks AW, Huang SK, Sampson H, Cockrell G, Helm RM, West CM, Bannon GA. Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h2. *Arch Biochem Biophys* 1997;342:224-253.

Stein R, Sherrill D, Morgan WJ, Holber CJ, Halonen M, Taussig LM y col. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999;354:541-545.

Steinman HA. "Hidden" allergens in foods. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:241-250.

Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000 Aug;55 Suppl 1:S2-10.

Strannegard Ö. Early sensitization to food antigens – when and how?. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12(14):20-23.

Strobel S. Oral Tolerance. En: *Mucosal immunity and gut epithelium: interactions in Health and Disease*. De. S Auricchio, A Ferguson, R Troncone. Karger, Basel, 1995, pp 65-75.

Suomalainen H, Soppi E, Isolauri E. Lymphocyte response to cow's milk proteins in patients with cow's milk allergy: relationship to antigen exposure. *Pediatr Allergy Immunol* 1994;5(1):20-26.

Sütas Y, Hurme M, Isolauri E. Oral allergen challenge abolishes antigen-specific interferon- $\gamma$  production in the peripheral blood of children with atopic dermatitis and cow milk allergy. *Clin Exp Allergy* 1997;27:277-283.

Sütas Y, Kekki OM, Isolauri E. Late onset reactions to oral food challenge are linked to low serum interleukin-10 concentrations in patients with atopic dermatitis and food allergy. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1121-1128.

Szczepanski M, Kaczmarek M. The level of interleukin-2 (IL-2) in blood serum in children with food sensitive atopic dermatitis. *Rocz Akad Med Białymst* 1995;40(3):692-695.

Tabar AI, Alvarez MJ, Echechipia SAS, Garcia BE, Olaguibel JM. Anaphylaxis from cow's milk casein. *Allergy* 1996; 51:343-345.

Tang ML, Coleman J, Kemp AS. Interleukin-4 and interferon-gamma production in atopic and non-atopic children with asthma. *Clin Exp Allergy* 1995 Jun;25(6):515-521.

Tang ML, Kemp AS. Ontogeny of IL4 production. *Pediatr Allergy Immunol* 1995 Feb;6(1):11-19.

Terr AI. Mecanismos de Hipersensibilidad. En: *Inmunología Básica y Clínica*. Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds). Ed. Manual Moderno, S.A. 1997;397-411.

Tianinen JM, Nuutinen OM, Kalavainen MP. Diet and nutritional status in children with cow's milk allergy. *Eur J Clin Nutr* 1995;49(8):605-612.

Toyonaga B, Mak TW. Genes of the T-cell antigen receptor in normal and malignant T cells. *Ann Rev Immunol* 1987;5:585-620.

Umetsu DT, DeKruyff RH. Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> cells in the pathogenesis of allergic disease. *PSEBM* 1997;215:11-19.

Vadas P, Wai Y, Burks W, Perelman B. Detection of peanut allergens in breast milk of lactating women. *JAMA* 2001 Apr 4;285(13):1746-1748.

Van den Toorn LM, Overbeek SE, de Jongste JC, Leman K, Hoogsteden HC, Prins JB. Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(11):2107-2113.

Van Sickle GJ, Powell GK, McDonald PJ, Goldblum RM. Milk and soy protein-induced enterocolitis: evidence for lymphocyte sensitization to specific food proteins. *Gastroenterology* 1985 Jun;88(6):1915-1921.

Vandezande LM, Wallaert B, Desreumaux P, Tsicopoulos A, Lamblin C, Tonnel AB, Janin A. Interleukin-5 immunoreactivity and mRNA expression in gut mucosa from patients with food allergy. *Clin Exp Allergy* 1999 May;29(5):652-659.

Verhaeghe B, Gevaert P, Holtappels G, Lukat KF, Lange B, Van Cauwenberge P, Bachert C. Up-regulation of IL-18 in allergic rhinitis. *Allergy* 2002 Sep;57(9):825-830.

Verkasalo M, Kuitenen P, Savilahti E, Tiilikainen A. Changing pattern of cow's milk intolerance. An analysis of the occurrence and clinical course in the 60s and mid-70s. *Acta Paediatr Scand* 1981;70:289-295.

Verwimp JJM, Bindels JG, Barents M, Heymans HSA. Symptomatology and growth in infants with cow's milk protein intolerance using two different whey-protein hydrolysate based formulas in a Primary Health Care setting. *Eur J Clin Nutr* 1995;49(Suppl. 1):39-48.

Vitoria JC. Cow's milk protein enteropathy. En: Businco L, Oehling A, Renner B, Moran. En: *Food Allergy in infancy*. Ed. Garsi 1992; 165-177.

Vitoria JC, Dalmau J, Ros L, Olivera JE, Sánchez-Valverde F. Enteropatía sensible a proteínas de leche de vaca. *An Esp Pediatr* 1995;42:355-360.

von Hertzen L, Klaukka T, Mattila H, Haahtela T Mycobacterium tuberculosis infection and the subsequent development of asthma and allergic conditions. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1211-1214.

Vonmutius E, Illi S, Hirsch T, Leupold W, Keil U, Weiland SK. Frequency of infections and risk of asthma atopy and airway hyperresponsiveness in children. *Eur Resp J* 1999;14:4-11.

Wahn U, Kulig M, Bergmann R, Kulig M, Forster J, Bergmann K, Bauer CP, Guggenmoos-Holzmann I. Indoor allergen exposure is a risk factor for early sensitisation during the first three years of life. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:763-769.

Wahn U. Aspects of nutritional management of food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12(Suppl 14):75-77.

Wahn U, Mutius E. Childhood risk factor for atopy and the importance of early intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:567-574.

Wal JM. Cow's milk allergens. *Allergy* 1998;53:1013-1022.

Wal JM. Structure and function of milk allergens. *Allergy* 2001;56(S67):35-38.

Wallaert B, Gosset P, Lamblin C, Garcia G, Perez T, Tonnel AB. Airway neutrophil inflammation in nonasthmatic patients with food allergy. *Allergy* 2002;57(5):405-410.

Walterspiel JN, Morrow AL, Guerrero ML, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK. Secretory anti-*Giardia Lamblia* antibodies in human milk: protective effect against diarrhea. *Pediatric* 1994;93:28-31.

Warner JA. Primary sensitization in infants. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;83:426-430.

Warner JO, Jones CA, Kilburn SA, Vance GHS, Warner JA. Pre-natal sensitization in humans. *Pediatr Allergy Immunol* 2000;13:68.

Warner JO. Future aspect of pharmacological treatment to inhibit the allergic march. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12(Suppl 14):102-107.

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann RT. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353.

Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 2001 Sep;3(11):947-954.

Werfel T, Ahlers G, Schmidt P, Boeker M, Kapp A, Neumann C. Milk-responsive atopic dermatitis is associated with a casein-specific lymphocyte response in adolescent and adult patients. *Allergy Clin Immunol* 1997 Jan;99(1 Pt 1):124-133.

Kondo N, Fukutomi O, Agata H, Yokoyama Y. Proliferative responses of lymphocytes to food antigens are useful for detection of allergens in nonimmediate types of food allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1997 Mar-Apr;7(2):122-126.

Wold AE, Adlerberth I. Breast feeding and the intestinal microflora of the infant-implications for protection against infectious diseases. *Adv Exp Med Bio* 2000;478:77-93.

Wühthrich B, Baumann E, Fries RA, Schnyder UW. Total and specific IgE (RAST) in atopic twins. *Clin Exp Allergy* 1981;11:147-154.

Xu Y, Kapp JA. Gammadelta T cells are critical for the induction of anterior chamber-associated immune deviation. *Immunology* 2001;104(2):142-148.

Yoshino S, Sagay M. Induction of systemic Th1 and Th2 immune responses by oral administration of soluble antigen and diesel exhaust particles. *Cell Immunol* 1999;192:72-78.

Yoshizawa Y, Nomagachi H, Izaki S, Kitamura K. Serum cytokine levels in atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 2002;27(3):225-229.

Young E, Stoneham M, Petruckevitch A, Barton J, Rona R. A population study of food intolerance. *Lancet* 1994;343:1127-1130.

Yunginger JW. Inmunología y alergia. En: *Compendio de Pediatría*. 1997;247-269.

Zivny JH, Moldoveanu Z, Vu HL, Russell MW, Mestecky J, Elson CO. Mechanisms of immune tolerance to food antigens in humans. *Clin Immunol* 2001 Nov;101(2):158-168.

Zuany-Amorim C, Ruffie C, Haile S, Vargaftig BB, Pereira P, Pretolani M. Requirement for  $\gamma\delta$  T cells in allergic airway inflammation. *Science* 1998;280:1265-1267.