



Universidad
de La Laguna

TESIS DOCTORAL

ALERGIA ALIMENTARIA

A PROTEINAS DE LECHE DE VACA:

Mecanismos inmunológicos

en sensibilización alérgica alimentaria,

implicaciones diagnósticas y pronósticas

Paloma Poza Guedes

2015

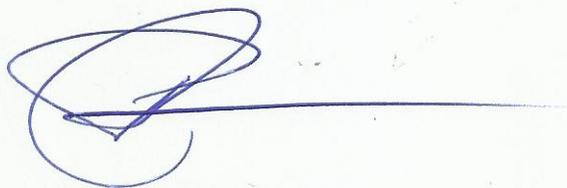
DIRECTOR: Ruperto González Pérez y Victor Manuel Matheu Delgado

D. Ruperto González Pérez y D. Víctor Manuel Matheu Delgado,

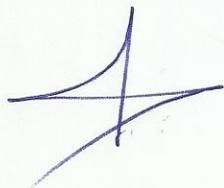
CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado "**Alergia alimentaria a proteínas de leche de vaca: Mecanismos inmunológicos en sensibilización alérgica alimentaria, implicaciones diagnósticas y pronósticas**", ha sido realizado bajo su dirección por la Licenciada en Medicina y Cirugía D^a. Paloma Poza Guedes, y reúne todos los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que así conste a todos los efectos, se extiende la presente certificación en San Cristóbal de La Laguna, a 16 de noviembre de 2015.



D. Ruperto González Pérez



D. Víctor Manuel Matheu Delgado

AGRADECIMIENTOS:

A todos los que durante mi formación como especialista en Alergología han influido de forma positiva compartiendo sus conocimientos, especialmente a Julia Rodríguez y Carlos Blanco, cuya curiosidad científica e interés por la alergia alimentaria han influido de forma decisiva en el camino que he elegido y me ha llevado hasta este proyecto que aquí aparece reflejado.

A mis compañeros, Inmaculada Sánchez y Victor Matheu, que en el día a día han dado sentido a la palabra equipo de trabajo, y gracias por compartir el duro camino de la investigación. A Yvelisse y Andrés, por acercarme la Inmunología y hacer fácil lo difícil.

A todos los miembros de la unidad de Alergia del Hospital del Tórax, que me han ayudado a vencer las dificultades durante estos años.

A mis directores de Tesis, Ruperto y Victor. Gracias por insistir en que continuara el proyecto y lo reflejara en este trabajo. A Ricardo Gutiérrez, por apoyarme en la elaboración y presentación de esta tesis doctoral.

A mi madre y toda mi familia, que han sabido comprender el tiempo robado para poder llevar a cabo este proyecto.

A mis hijas, Elena, Paula e Irene, y a mi marido Ruperto, por su comprensión y apoyo. Sin ellos este trabajo no hubiera visto la luz.

A Elena, Paula, Irene y Ruperto,

mí vida y mí corazón

INDICE

Lista de ABREVIATURAS.....	A
<u>1.- INTRODUCCION.....</u>	1
1.1.- CONCEPTO de Alergia Alimentaria.....	1
1.2.- EPIDEMIOLOGIA.....	3
1.3.- LA LECHE como Alimento.....	4
1.3.1.- Funciones biológicas.....	4
1.3.2.- Tipos de leche.....	5
1.3.3.- Propiedades Físicas.....	6
1.3.4.- Propiedades Químicas.....	6
1.3.5.- Composición Proteica.....	6
1.4.- CLINICA de Alergia Alimentaria.....	9
1.4.1.- Anafilaxia.....	9
1.4.2.- Gastrointestinal.....	10
1.4.3.- Cutánea.....	11
1.4.4.- Respiratoria.....	12
1.4.5.- Síndrome de Heiner.....	12
1.5.- DIAGNOSTICO de Alergia Alimentaria.....	14
1.6.- MECANISMOS BASICOS en Alergia Alimentaria.....	17
1.6.1.- Proceso de reconocimiento antigénico.....	17
1.6.2.- Proceso de sensibilización alérgica.....	19
1.6.3.- Reacciones de hipersensibilidad.	25
1.6.4.- Factores angiogénicos y Alergia.....	26
1.7.- HISTORIA NATURAL de la Alergia Alimentaria.....	29

1.8.- ANTECEDENTES HISTORICOS en Desensibilización Alimentaria.....	31
1.9.- MECANISMOS INMUNOLÓGICOS en Desensibilización e Inmunoterapia oral con Alimentos.....	33
2.- OBJETIVOS:	38
2.1.- Objetivos principales.....	38
2.2.- Objetivos secundarios.....	38
3.- MATERIAL Y METODOS:	39
3.1.- MATERIAL	39
3.1.1.- CONSULTA DE ALERGOLOGIA.....	39
A.- Zona de Policlínica.....	39
B.- Zona de Tratamientos Biológicos.....	40
C.- Unidad de Alimentos y Medicamentos.....	41
D.- Recursos Humanos.....	42
3.1.2.- PACIENTES ALERGICOS a PROTEINAS de LECHE.....	43
3.1.2.1.- Origen de los Pacientes.....	43
3.1.2.2.- Selección de Pacientes.....	44
3.1.3.- ALIMENTO: La leche de vaca.	47
3.2.- METODOS	48
3.2.1.- PRUEBAS CUTANEAS	48
3.2.1.1.- Prick Test.....	48
3.2.1.2.- Prick-Prick Test.....	51
3.2.2.- DETERMINACION DE INMUNOGLOBULINA ESPECIFICA SERICA..	52
3.2.3.- CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS.....	53

3.2.3.1.- MATERIALES.....	54
3.2.3.2.- PREPARACION de muestras y estándares.....	54
3.2.3.3.- PROCEDIMIENTO.....	55
3.2.4.- TEST de PROVOCACION ORAL.....	56
3.2.4.1.- Método e indicaciones.....	56
3.2.4.2.- Tipos de Provocaciones.....	59
3.2.5.- PROTOCOLO de DESENSIBILIZACION ALERGICA A PROTEINAS DE LECHE DE VACA.....	60
3.2.5.1.- Selección de pacientes candidatos	60
3.2.5.2.- Requisitos para el Procedimiento.....	61
3.2.5.3.- Protocolo de desensibilización.....	62
3.2.5.4.- Seguimiento evolutivo de la Desensibilización alimentaria.....	63
4.- RESULTADOS.....	66
4.1.- PRIMERA FASE DEL ESTUDIO.....	66
4.1.1.- Muestra de pacientes.....	66
4.1.2.- Manifestaciones clínicas.....	66
4.1.3.- Antecedentes personales.....	67
4.1.4.- Proceso de desensibilización.....	69
4.1.5.- Reacciones adversas.....	69
4.2.- SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO.....	71
4.2.1.- Niveles séricos Basales de IgE específica a Leche.....	71
4.2.2.- Evolución inmunológica inicial: niveles séricos de IgE específica a leche por paciente.....	72

4.2.3.- Evolución a largo plazo: niveles séricos de IgE específica a leche y proteínas de leche.....	76
4.2.4.- Evolución a largo plazo: niveles séricos de IgG específica a leche y proteínas de leche.....	80
4.3.- TERCERA FASE DEL ESTUDIO.....	85
4.3.1.- Reacciones adversas	85
4.3.2.- Tratamiento de reacciones adversas.....	87
4.3.3.- Cofactores asociados	89
4.4.- CUARTA FASE del ESTUDIO.....	91
4.4.1.- Beta-NGF.....	92
4.4.2.- EOTAXINA.....	93
4.4.3.- IL-12 p40.....	94
4.4.4.- IP-10.....	95
4.4.5.- MCP-1.....	96
4.4.6.- MIP1-alpha.....	97
4.4.7.- PDGF-BB.....	98
4.4.8.- VEGF-A.....	99
4.4.9.- GM-CSF.....	100
4.4.10.- IL-1 Beta.....	101
4.4.11.- IL-13.....	102
4.4.12.- IL-4.....	103
4.4.13.- IL-5.....	104
4.4.14.- IL-12 p70.....	105
4.4.15.- IFN-gamma.....	106

4.5.- QUINTA FASE DEL ESTUDIO	109
4.5.1.- Muestra de pacientes.....	109
4.5.2.- Resultados de citoquinas.....	110
5.-DISCUSION	112
5.1.- PRIMERA FASE	115
A) Características de la muestra.....	115
B) Resultados del procedimiento de Desensibilización leche.....	119
5.2.- SEGUNDA FASE	123
A) Evolución de la IgE específica a leche y sus proteínas.....	123
B) Evolución de la IgG específica a leche y sus proteínas.....	130
5.3.- TERCERA FASE	134
A) Tipos de reacciones adversas y frecuencia observada.....	134
B) Cofactores asociados a las reacciones adversas.....	137
5.4.- CUARTA FASE	140
5.5.- QUINTA FASE	147
6.-CONCLUSIONES	150
7.-BIBLIOGRAFIA	153
8.- ANEXOS	171
- ANEXO 1: Consentimiento informado de pacientes y Hoja informativa.	
- ANEXO 2: Protocolo de Desensibilización a Leche	
- ANEXO 3: Aprobación del Comité de ética hospitalario	
- ANEXO 4: Listado de Comunicaciones y Publicaciones	

LISTA de ABREVIATURAS

AINE: anti-inflamatorios no esteroideo

BNGF: factor de crecimiento del neutrófilo beta

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CPA: célula presentadora de antígenos

DUE: diplomado universitario de enfermería

EGF: factor de crecimiento epidérmico

etc: etcétera

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

GM-CSF: Factor estimulante de colonias granulocíticas

HUNSC: hospital universitario nuestra señora de Candelaria

Ig: inmunoglobulina

Ig A: inmunoglobulina tipo A

Ig D: inmunoglobulina tipo D

Ig E: inmunoglobulina tipo E

Ig G: inmunoglobulina tipo G

Ig M: inmunoglobulina tipo M

im: intramuscular

iv: intravenoso

IFN-gamma: Interferón gamma

IL: Interleuquina o Interleucina

IP-10: proteína inducible por IFN-gamma 10

ITO: inmunoterapia oral

ITsc: inmunoterapia subcutánea

ITsl: inmunoterapia sublingual

kU/L: kilounidades por litro

MALT: tejido linfoide asociado a mucosa

MCP-1: Proteína quimiotáctica del Monocito 1

M-CSF: Factor estimulante de colonias monocitarias

MIP-1Alfa: Proteína inflamatoria de macrófago 1-alfa

mg: miligramos

ml: mililitros

mm: milímetros

PAF: Factor activador de plaquetas

PCR: reacción de cadena de polimerasa

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

pg/ml: picogramos por mililitro

RCP: reanimación cardiopulmonar

rpm: revoluciones por minuto

SNC: sistema nervioso central

Tc: linfocito T citotóxico

TGF-alfa: factor de crecimiento transformante alfa

Th: linfocito T helper

Th0: linfocito T helper nativo

Th1: linfocito T tipo 1

Th2: linfocito T tipo 2

TNF: Factor de necrosis tumoral

Treg: linfocitos T reguladores

UCI: unidad de cuidados intensivos

1.- INTRODUCCION

1.1.- CONCEPTO de ALERGIA ALIMENTARIA y CLASIFICACION

El término de *alergia alimentaria* ha suscitado una gran confusión en las últimas décadas al ser utilizado de forma ambigua incluyendo a distintas enfermedades, como la intolerancia digestiva a lactosa o enfermedades inflamatorias de base inmune como la celiacía. Esto ha sido provocado por la falta de uniformidad dentro de la comunidad científica sobre los criterios clínicos y la terminología exacta.

La respuesta esperada de nuestro organismo y sistema inmune frente al contacto con los alimentos es la tolerancia. Cuando el sistema inmunitario genera una respuesta aberrante ante cualquier alimento que conduce a la aparición de reacciones clínicas adversas, nos encontramos con lo que se conoce como *alergia a los alimentos*.¹ Bajo este concepto se pueden englobar diversas reacciones a alimentos producidas por diferentes mecanismos inmunológicos, celulares y humorales, que abarcan un amplio abanico de reacciones adversas. Para intentar resolver esta confusión, en los años 80 se publicó una nomenclatura que clasificaba las reacciones adversas a alimentos, diferenciando entre las reacciones *alérgicas* o mediadas por mecanismos inmunológicos, y las reacciones de *intolerancia* o no mediadas por mecanismos inmunológicos.²

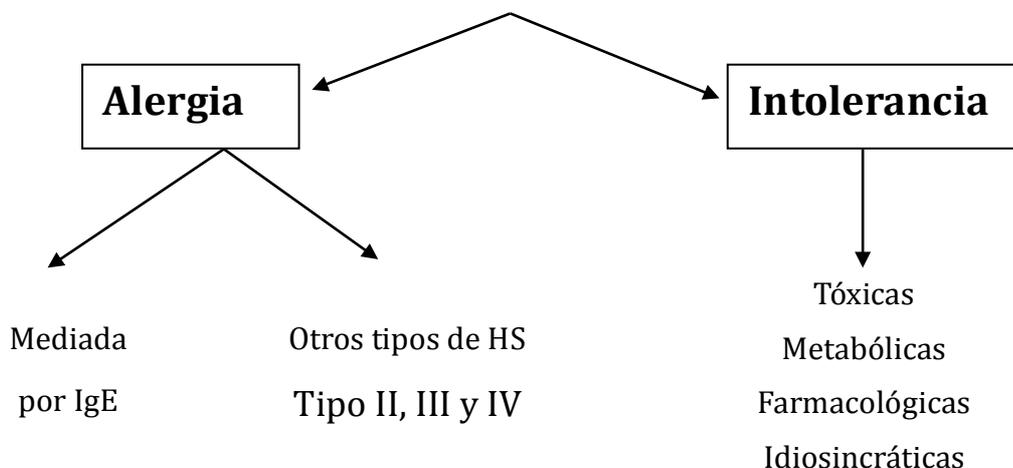


Imagen: Clasificación de Reacciones adversas a alimentos¹

En la década de los 90 se publicó un nuevo documento de consenso que clasificaba las reacciones adversas en función del tipo de mecanismo implicado, inmunológico o no inmunológico –enzimático, farmacológico, etc-, así como según el mecanismo inmunológico responsable, principalmente si estaban mediadas por IgE o no.³

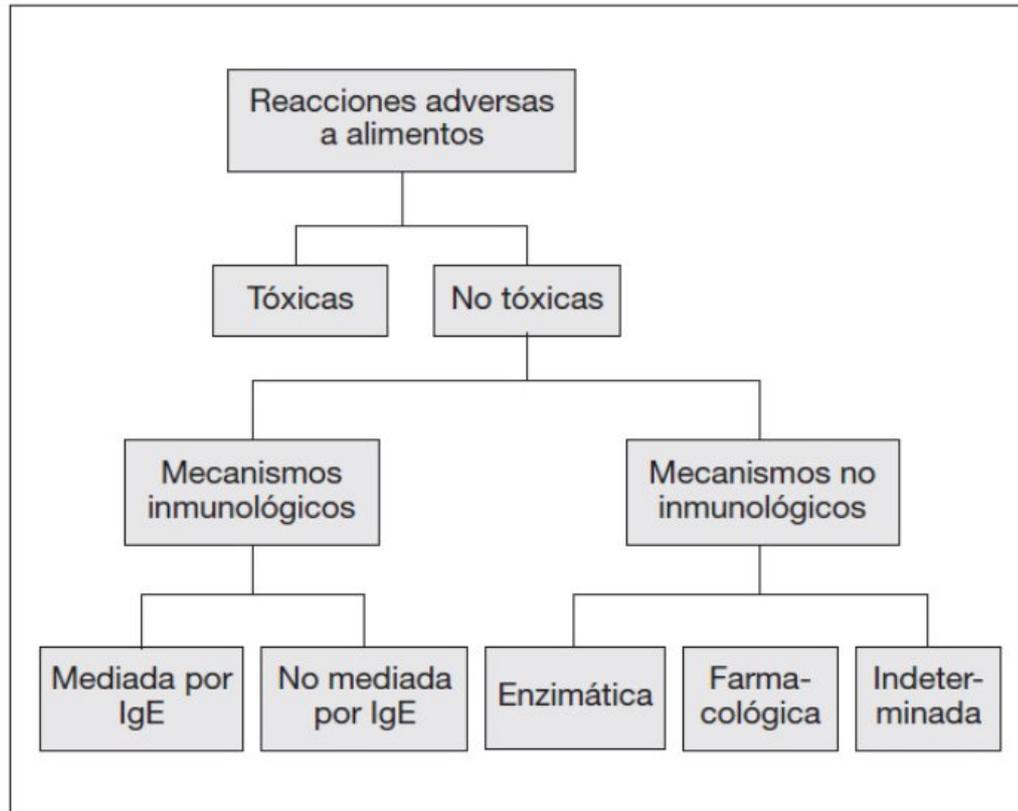


Imagen: Clasificación de Reacciones adversas⁷

Para unificar los términos y conceptos, en 2003 se publicó un consenso de terminología por el Comité de la Organización mundial de Alergia o WAO, que revisaba y unificaba algunos conceptos utilizados habitualmente en el campo de la Alergología, y que actualmente sigue vigente.⁴

1.2.- EPIDEMIOLOGIA.

En los últimos años el aumento de la prevalencia de la alergia alimentaria de forma global, tanto en población adulta como infantil,⁵ ha suscitado un renovado interés por ampliar el conocimiento más profundo de esta entidad. Se hace necesario optimizar el diagnóstico y mejorar las herramientas disponibles, así como buscar nuevas técnicas o procedimientos que aseguren detectar estos pacientes de forma precoz y rápida, con el mejor resultado posible valorando el riesgo/beneficio que conlleva cualquier procedimiento.⁶

Según los principales estudios epidemiológicos realizados durante los últimos años en diferentes países, se estima que la alergia a alimentos afecta aproximadamente al 3,5% de la población general, y es mucho más frecuente en los niños, oscilando entre el 5 y el 8%.⁷⁻⁹

A principios de los años 90 se realizó en España un estudio epidemiológico multicéntrico llamado *Alergológica 95* patrocinado por la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica o SEAIC, en el que se analizaron los datos clínicos de pacientes que acudían por primera vez a la consulta de Alergología de centros sanitarios de todas las provincias. En este estudio se recogió que el 3,6% de los pacientes que acudían presentaban sensibilización a algún tipo de alimento.⁵

Unos años más tarde, se repetía el mismo estudio llamado *Alergológica 2005*, demostrando que la prevalencia en ese momento era del 7,4%, variando según provincias entre un 2,3% y un 13%, y que por tanto, la alergia a alimentos en nuestro país se había duplicado. La rapidez de estos cambios ha suscitado que actualmente se realice el mismo estudio periódicamente para monitorizar estos cambios en la población, y se estima que en 2016 se publicarán los nuevos resultados de *Alergológica*.¹⁰

1.3.- LA LECHE COMO ALIMENTO

Según la Real academia de lengua española¹¹ la leche (del latín *lac, lactis*) es un líquido blanco que segregan las mamas de las hembras de los mamíferos para alimento de sus crías. El alimento llamado comúnmente *leche* es una secreción nutritiva de color blanquecino opaco producida por las células secretoras de las glándulas mamarias o mamas de las hembras de los mamíferos.¹²

Las leches de algunos de los mamíferos domésticos, de vaca principalmente, pero también de búfala, oveja, cabra, yegua, camella y otros, forman parte de la alimentación humana corriente en algunas culturas, base de numerosos productos lácteos, como la mantequilla, el queso y el yogur, entre otros.¹² La leche de mujer es el alimento específico y, por lo tanto, el más adecuado para el niño durante los primeros meses de su vida. Su contenido en proteínas es de 0,9-1,1 g/100 ml, con un 60% de proteínas séricas o suero de la leche, y un 40% de caseína.

Cuando la mujer no puede mantener la lactancia, la alimentación del bebé se sustituye total o parcialmente por leche de vaca, que tiene un mayor contenido en proteínas (3-3,5 g/100 ml). Las caseínas constituyen en este caso la mayor parte, con un 80% del total, y las proteínas del suero representan el 20%. Esto supone que durante este cambio de lactancia el niño está sometido a un cambio tanto cuantitativo como cualitativo de exposición a diferentes composiciones del alimento, sobretodo proteica.¹³

1.3.1.- La leche ejerce diversas Funciones biológicas conocidas:¹²

1. La función biológica de la leche es la de nutrir a las crías hasta que sean capaces de ingerir y digerir otros alimentos.
2. También tiene otras funciones orgánicas como proteger el tracto gastrointestinal contra patógenos y toxinas
3. Regulación metabólica de los procesos de obtención de energía, en especial el metabolismo de la glucosa y la insulina.

1.3.2.- Tipos de leche:¹²

La leche está compuesta principalmente por agua con más de un 80%, con iones (sal, minerales y calcio), glúcidos como lactosa, materia grasa y proteínas. La presentación de diferentes tipos de leche en el mercado según su composición es amplia:

- Entera: un contenido en grasa entre 3,1 % y 3,8 % .
- Leche desnatada: contenido graso inferior al 0,3 %
- Semidesnatada: con contenido graso entre 1,5 y 1,8 %
- Leche in Lactosa: se somete a un proceso en el cual se transforma la lactosa en glucosa y galactosa para hacerla de mayor digestibilidad.
- Saborizada: es la leche azucarada o edulcorada a la que se le añaden sabores. Normalmente son desnatadas o semidesnatadas.
- En polvo o Liofilizada: a esta leche se le ha extraído el 95 % del agua mediante procesos de atomización y evaporación. Para su consumo solo hay que rehidratarla con agua o con leche.
- Condensada, concentrada o evaporada: a esta leche se le ha extraído parcialmente el agua y se presenta mucho más espesa que la leche fluida normal. Puede que contenga azúcar añadida.
- Enriquecidas: son preparados lácteos a los que se le añade algún producto de valor nutritivo como vitaminas, calcio, fósforo, omega-3, etc.

	Energía (Kcal.)	Agua gr.	Proteínas gr.	Lípidos gr.				Glúcidos gr.	Vitaminas µg.		Minerales	
				AGS	AGM	AGP	Colesterol (mg)		A	D	Ca	Mg
Leche entera, pasteurizada	62	88.6	3.2	2.02	1.06	0.13	13	4.7	42	0.03	122	11
Leche entera, UHT	63	88.0	3.1	2.20	1.05	0.12	14	4.7	42	tr	113	11
Leche semi-desnatada, UHT	47	91.6	3.4	1.04	0.47	tr	7	4.6	20	tr	120	11
Leche desnatada, UHT	36	91.4	3.9	0.04	tr	tr	2	4.6	0	tr	116	20

Tabla: Composición de diversos tipos de leche¹²

1.3.3.- Propiedades físicas

La leche de vaca tiene una densidad media de 1,032 g/ml. Es una mezcla compleja compuesta por un sistema coloidal de tres fases:

- Solución: los minerales y los glúcidos se encuentran disueltos en el agua.
- Suspensión: las sustancias proteicas se encuentran no disueltas en el agua sino en suspensión.
- Emulsión: la grasa en agua se presenta como emulsión.

Contiene una proporción importante de agua cercana al 87 %. El resto constituye el extracto seco que representa 130 gramos por litro y en el que hay de 35 a 45 gramos de materia grasa.¹⁴

1.3.4.- Propiedades químicas

El pH de la leche es ligeramente ácido, comprendido entre 6,6 y 6,8. La leche contiene diferentes grupos de nutrientes: los componentes orgánicos como glúcidos, lípidos, proteínas, vitaminas, y los componentes minerales, como Ca⁺, Na⁺, K⁺, Mg⁺, etc. Las sustancias orgánicas están presentes en cantidades más o menos iguales y constituyen la principal fuente de energía.¹⁵

1.3.5.- Composición proteica.-

Las sustancias proteicas de la leche son las más importantes en el aspecto químico. Se clasifican en dos grupos: proteínas de función estructural (la caseína se presenta en 80 % del total, mientras que las proteínas del suero son un 20 %) y las enzimas.¹⁶⁻¹⁷

Componentes	Especies de mamíferos			
	humana	bovina	ovina	caprina
proteínas (% del total lácteo)	1,3-1,5	3,2-3,5	5,4-6,0	3,1-4,0
caseínas (% del total proteico)	44,9	82,5	84,8	81,3

Tabla: Contenido proteico de la leche de algunas especies animales.¹²

A.- Actividad enzimática depende de dos factores: La fosfatasa es un inhibidor a temperaturas de pasteurización e indica que se realizó bien la pasteurización. La reductasa es producida por microorganismos ajenos a la leche y su presencia indica que está contaminada. La xantoxidasa en combinación con nitrato de potasio (KNO_3) inhibe el crecimiento de bacterias butíricas. La lipasa oxida las grasas y da olor rancio a los productos y se inhibe con pasteurización. La catalasa se incrementa con la mastitis y, si bien no deteriora el alimento, se usa como indicador microbiológico.

B.- Caseínas: Es la proteína más importante en la leche de vaca, un 80%. Se han descrito diversos subtipos: caseína- α_1 (23-25000 daltons), caseína- α_2 (23-25000 daltons), caseína- β (24.000 daltons), caseína- γ (11-20000 daltons), y caseína- κ (19000 daltons). De todas las proteínas presentes en la leche, las más comunes y representativas son tres, y todas son caseínas: la caseína- α_1 , la caseína- β y la caseína- κ . La caseína- κ es la más abundante de este tipo de caseínas en la leche de vaca, mientras que es la más pobre en la leche humana.¹⁸⁻¹⁹

C.-Las proteínas del suero son compactas, globulares, con un peso molecular que varía entre 14.000 y 1.000.000 daltons, y son solubles en un amplio intervalo de pH (se mantienen intactas cuando la leche se corta de manera natural, ya que no ha habido presencia de calor que desnaturalice las proteínas). En estado natural no se asocian con las caseínas, pero en la leches tratadas térmicamente y homogeneizadas, una parte de estas proteínas sí lo hace. Las proteínas del suero constan por lo menos de 8 fracciones diferentes, todas sensibles a temperaturas altas (procesos térmicos) y por ello son las primeras en degradarse con procesos como la pasteurización o la UHT.

Las proteínas del suero con mayor importancia en la leche son:

a) **α -lactalbúmina**: constituye el sistema enzimático requerido para la síntesis de la lactosa (14000 daltons). Las leches de animales que no presentan esta proteína tampoco contiene lactosa. Posee bajo peso molecular y un alto contenido en triptófano. Se desnaturaliza a 63 °C.

b) **β -lactoglobulina**: se desnaturaliza y precipita a menos de 73 °C (no

resiste la pasteurización). Esta proteína (36000 daltons) no se encuentra en la leche humana, siendo abundante especialmente en rumiantes. Existen tratamientos industriales que permiten modificar los componentes de la leche de vaca para que se parezcan a los de la leche humana. En estos procesos se elimina ésta fracción proteínica por precipitación con polifosfatos o por filtración en gel, para después mezclarla con otros componentes (caseína, aceite de soja, minerales, vitaminas, lisozima, etc.).

c) **Inmunoglobulinas:** suman el 10 % del total de las proteínas del suero y provienen de la sangre del animal (150-900.000 daltons). Pertenecen a los tipos IgA e IgE y proceden de las células plasmáticas del tejido conjuntivo de la mama.²⁰ Algunos científicos, según se ha dicho antes, ven en ello la razón de ser de la leche, ya que permiten transmitir cierta inmunidad al bebé (principalmente la memoria de las enfermedades que la madre ha sufrido). Suelen ser muy abundantes en el calostro (hasta 100g/L).

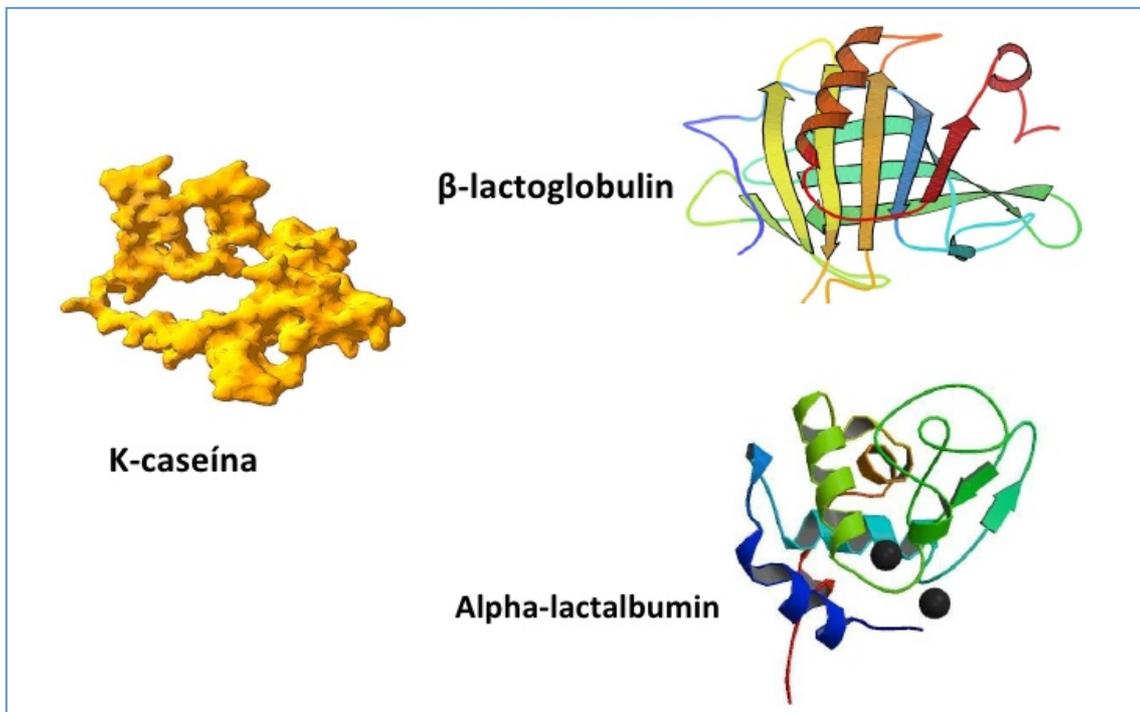


Tabla: Principales antígenos proteicos de la leche¹²
(adaptado de Wikipedia)

1.4- CLINICA de ALERGIA ALIMENTARIA.

Según recogen las “Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States” elaboradas por Boyce y colaboradores en 2010, la alergia alimentaria puede ser responsable de producir diferentes síndromes clínicos específicos, que pueden definirse y clasificarse de la siguiente manera.²¹

1.4.1.- Anafilaxia producida por alimentos: reacción alérgica grave mediada inmunológicamente por una gammaglobulina, la inmunoglobulina E (IgE), de rápida instauración y potencialmente mortal.²² Se trata de una Urgencia médica vital. Se cree que la anafilaxia por alimentos mediada por IgE implica la liberación de mediadores sistémicos de mastocitos y basófilos sensibilizados.

En ciertos casos como la anafilaxia por alimentos *inducida por ejercicio*, la aparición de las reacciones depende del lapso temporal, generalmente en las 2 horas siguientes, entre la ingesta del alimento y la práctica de ejercicio.

<h2>Anafilaxia - Síntomas</h2>	
<p>Reacción Alérgica Generalizada</p> <ul style="list-style-type: none"> • Síntomas Cutáneos <ul style="list-style-type: none"> – Rash generalizado – Prurito – Rinitis/conjuntivitis – Urticaria – Edema local – Angioedema • y/o Síntomas Gastrointestinales <ul style="list-style-type: none"> – Vómitos – Deposiciones desligadas – Dolor Abdominal 	<p>Anafilaxia</p> <ul style="list-style-type: none"> • Síntomas Respiratorios <ul style="list-style-type: none"> – Taquipnea – Disnea – Uso de m. accesorios – Cianosis – Sibilancias – Broncoespasmo – Estridor laríngeo / Disfonía • Cardiovascular <ul style="list-style-type: none"> – Hipotensión – Mareos – Síncope – Pérdida de conciencia – Glasgow < 15 (ajustado a edad)

Tabla: Síntomas de la Anafilaxia^{1,13}

1.4.2.- Alergia alimentaria gastrointestinal: incluye un grupo variado de patologías producidas como resultado de reacciones adversas inmunológicas frente a antígenos alimentarios. A pesar de que puede existir un amplio solapamiento clínico entre estas entidades, se han descrito varios síndromes específicos:

A.- Hipersensibilidad gastrointestinal inmediata: referida a manifestaciones clínicas que son IgE-mediadas que pueden ocurrir de forma inmediata (en minutos) en el tracto gastrointestinal superior y de forma inmediata o tardía (varias horas más tarde) en el tracto gastrointestinal inferior. Se considera habitualmente una manifestación de anafilaxia. Los vómitos agudos e inmediatos suponen la manifestación clínica gastrointestinal más frecuente y de las mejor documentadas inmunológicamente como IgE mediadas.²³

B.- Esofagitis eosinofílica: requiere la presencia de inflamación eosinofílica localizada en el esófago. En algunos pacientes la evitación de alimentos específicos es capaz de normalizar la histopatología de la mucosa esofágica. Aunque se trata de una entidad con presencia de alergia alimentaria IgE mediada, no queda claro el papel que ésta desempeña en su etiología. Se cree que existen implicados tanto mecanismos IgE mediados como no IgE mediados.²⁴

En los niños la esofagitis eosinofílica puede manifestarse en forma de trastornos alimentarios, vómitos, reflujo y dolor abdominal. En adolescentes y adultos la forma más frecuente de presentación es la disfagia y la impactación esofágica de alimentos.²⁵

C.- Gastroenteritis eosinofílica: también se encuentra vinculada a alergia alimentaria y nuevamente aparecen implicados tanto mecanismos IgE como no-IgE mediados. Los síntomas varían según el segmento afectado del tracto gastrointestinal con infiltración eosinofílica localizada o generalizada. La esofagitis eosinofílica es una manifestación de la gastroenteritis eosinofílica.²³

D.- Proctocolitis alérgica por proteínas alimentarias: aparece en niños aparentemente sanos que presentan restos de sangre y moco en heces. No hay relación con IgE y alimentos. La ausencia de síntomas sistémicos, vómitos, diarrea y fallo de medro, distingue a esta entidad de otras gastroenteropatías relacionadas con alergia alimentaria que cursan con hallazgos similares en heces. Se cree que la aparición de síntomas durante el período de lactancia es debida a la secreción en leche materna de alérgenos alimentarios por ingesta materna.²³

E.- Síndrome de enterocolitis causada por proteínas alimentarias: se trata de una entidad clínica no mediada por IgE que afecta a niños pequeños en forma de emesis crónica, diarrea y fallo de medro. La re-exposición al alimento implicado tras un período de evitación puede presentarse de forma subaguda con emesis de repetición y deshidratación. Los alimentos más relacionados son leche y soja, aunque también se han descrito arroz, avena y otros cereales mientras que en adultos se vincula a crustáceos.²⁶

F.- Síndrome de alergia oral: se trata de una alergia local mediada por IgE frente a frutas o verduras con síntomas limitados a labios, boca y garganta. Generalmente asociado a la alergia respiratoria a pólenes. Los síntomas incluyen picor y/o sensación de hormigueo en labios, lengua, paladar y garganta con o sin inflamación asociada.

1.4.3.- Reacciones cutáneas con diferentes formas de presentación: mediadas por IgE –como urticaria, angioedema, flush, prurito-, celulares –como dermatitis de contacto, dermatitis herpetiforme- y mixtas -dermatitis atópica-.²⁷

A.- Urticaria aguda: es una manifestación clínica frecuente a pesar de que la alergia a alimentos no es la primera causa de urticaria aguda, y está muy poco relacionada con la urticaria crónica. Se caracteriza por la aparición de lesiones cutáneas habonosas polimórficas, redondeadas o irregulares, pruriginosas y de diferentes tamaños de forma inmediata tras la ingesta del alimento causal.

B.- Angioedema: suele acompañarse de urticaria aguda y presenta un mecanismo mediado por IgE. Se caracteriza por una inflamación edematosa, no pruriginosa del tejido subcutáneo (manos, párpados, labios, glúteos y genitales), órganos abdominales o el tracto respiratorio superior.²⁷ Cuando esta última parte está implicada, el angioedema laríngeo es una verdadera urgencia médica. Tanto la urticaria aguda como el angioedema se asocian frecuentemente a anafilaxia.

C.- Dermatitis atópica o eczema atópico: el papel de la alergia alimentaria como agente etiopatogénico resulta controvertido.²⁸ Se ha relacionado en muchos niños casos de agravamiento de dermatitis atópica con la ingesta de alimentos.²⁷

D.- Dermatitis alérgica de contacto: tipo de eczema mediado por células debido a haptenos químicos presentes en aditivos alimentarios o presentes de forma natural en alimentos como el mango.²⁹

Sus síntomas clínicos incluyen prurito intenso, eritema, pápulas, vesículas y edema. Puede ser por mecanismos inmunológicos, IgE mediada o celular, o no inmunológicos, con liberación inespecífica de histamina.

1.4.4.- Síntomas respiratorios: Ocurren generalmente durante una reacción alérgica sistémica y conllevan una mayor gravedad en las reacciones anafilácticas. No es frecuente que la alergia alimentaria pueda producir síntomas respiratorios, como rinitis o asma, de forma aislada.³⁰

1.4.5.- Síndrome de Heiner: enfermedad poco frecuente que afecta a niños. Producido inicialmente por la ingesta de leche, se caracteriza por síntomas crónicos o recurrentes en la vía respiratoria inferior asociando infiltrados pulmonares, síntomas en la vía respiratoria superior, gastrointestinales, fallo de medro o anemia ferropénica.³¹ Se relaciona con respuestas no IgE mediadas como anticuerpos que precipitan frente a fracciones de proteínas de leche.

Entre los hallazgos analíticos destacan la eosinofilia periférica, el déficit de hierro, y los depósitos de inmunoglobulinas y C3 en biopsias pulmonares. La evitación de leche produce mejoría clínica en días con aclaramiento de los infiltrados pulmonares en semanas.³²

Se desconoce la inmunopatogenia de esta entidad que combina reacciones celulares y por inmunocomplejos produciendo vasculitis alveolar. No existen evidencias de que relacionen esta entidad con la alergia a proteínas de leche mediada por IgE.

Tabla: Síntomas y signos compatibles con reacción alérgica a alimentos.

CUTANEOS
Urticaria, Angioedema Eritema difuso, Flush facial Rash eritematoso pruriginoso Dermatitis atópica Dermatitis de contacto
DIGESTIVOS
Prurito y/o edema de labios, lengua o mucosa oral Dolor abdominal Náuseas/vómitos Diarrea, alteración ritmo intestinal Reflujo gastroesofágico
RESPIRATORIOS
Rinitis, congestión nasal, prurito, rinorrea y/o estornudos Edema laríngeo, tos faríngea y/o disfonía Tos persistente, sibilancias y/o disnea
CARDIOVASCULAR
Mareo, mal estar general Hipotensión, desvanecimiento

1.5.- DIAGNOSTICO en Alergia Alimentaria

Para realizar un correcto diagnóstico en alergia alimentaria, lo primero y esencial es recoger una historia clínica muy detallada de las características de la reacción que ha presentado el paciente, para intentar identificar a aquellos posibles alimentos responsables, establecer una relación temporal entre su ingestión y la aparición de los síntomas, y decidir las pruebas diagnósticas más adecuadas que se deban realizar con el fin de demostrar una respuesta inmunológica mediada por IgE al alimento.¹

En la actualidad existen diferentes pruebas diagnósticas que ponen de manifiesto la existencia de una respuesta inmune tipo IgE contra el alimento - Ver Métodos-,³⁻³³ como son las *pruebas cutáneas* de lectura inmediata o pruebas en prick, y determinaciones analíticas de IgE específica en suero frente a los alimentos. Las determinaciones de IgG en suero frente a alimentos se considera que no tienen ningún valor diagnóstico claro en la alergia a alimentos, ni sirven para dar ninguna recomendación dietética a los pacientes alérgicos, ya que se acepta que indican fundamentalmente exposición o contacto sin que esté claro su grado de correlación.

La detección y cuantificación de IgE específica en suero es considerado como un método complementario a las pruebas cutáneas ante la sospecha de alergia alimentaria -ver Métodos-,³⁴ sobretudo cuando la realización de éstas no es posible o con resultados no válidos por la existencia de enfermedades concomitantes, cutáneas o sistémicas, o por el uso de medicación que inhibe total o parcialmente la respuesta cutánea -Ver Listado en Métodos, Pruebas cutáneas-, o incluso en el caso de alergias alimentarias muy graves que desaconsejan el uso de las pruebas cutáneas con alimentos.³³

Posteriormente se ha ensayado con la cuantificación de IgG específica sérica a los alimentos como marcador de exposición o de posible tolerancia inmunológica, pero su interpretación clínica aún no queda claramente

determinada -ver Métodos- y se precisan más estudios para conocer el significado de su detección en sangre.³⁵

Aunque existen recomendaciones publicadas que funcionan como guías de actuación para la adecuada aplicación de los métodos diagnósticos elaboradas por comités científicos,³⁵⁻³⁷ durante el estudio diagnóstico de alergia alimentaria existen casos en los que la historia clínica y las pruebas complementarias básicas descritas como pruebas cutáneas y la detección de niveles de IgE sérica -ver introducción y métodos- no son concluyentes a la hora de confirmar o descartar la alergia alimentaria.

Es preciso utilizar en estos casos, una *prueba de provocación o exposición controlada* -ver Métodos- que ponga en evidencia si existe un respuesta clínica adversa al alimento por parte del paciente con manifestaciones clínicas confirmatorias de la existencia de alergia alimentaria.³⁸ El hecho de que el paciente pueda manifestar síntomas clínicos de reacción adversa alimentaria potencialmente graves -ver Clínica en Introducción- durante el procedimiento de provocación oral con el alimento, implica una serie de riesgos potenciales para el paciente que obliga a realizar una valoración previa de riesgos/beneficios antes de hacer la indicación del procedimiento.

Por todo esto, se han sugerido en los protocolos publicados una serie de indicaciones y contraindicaciones a la hora de establecer si se debe o no realizar un procedimiento de este tipo.³⁵⁻³⁷

En caso de que no se objetivara ningún tipo de síntoma o signo sugerente de respuesta clínica confirmatoria de alergia alimentaria, se concluiría que el paciente *no es alérgico*, o que sólo está sensibilizado inmunológicamente si se ha hallado IgE específica al alimento previamente.

En las reacciones no IgE mediadas o mixtas la aplicación de técnicas como las pruebas cutáneas o la determinación de IgE específica sérica presentan una rentabilidad diagnóstica inferior o no tienen indicación.³⁹ Debido a esto, en numerosas ocasiones se hace necesario para confirmar si el alimento es responsable de la clínica manifestada de alergia alimentaria, realizar pruebas de provocación con el propio alimento implicado.³⁵⁻³⁸

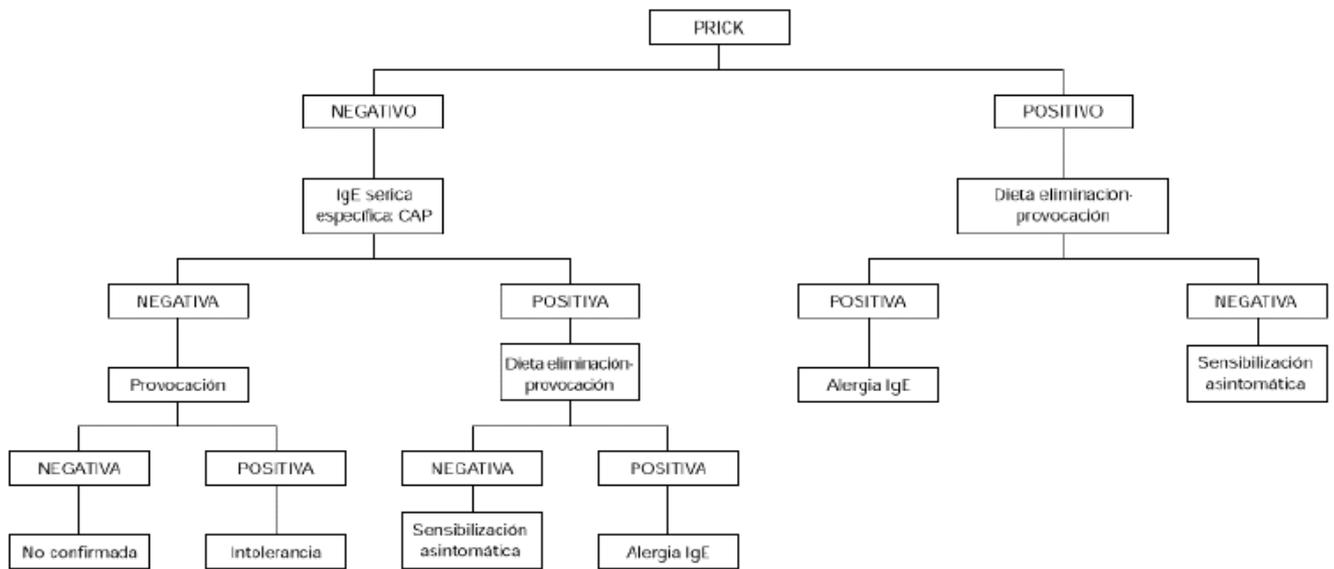


Imagen: Algoritmo diagnóstico en Alergia Alimentaria (de Martorell 2001)

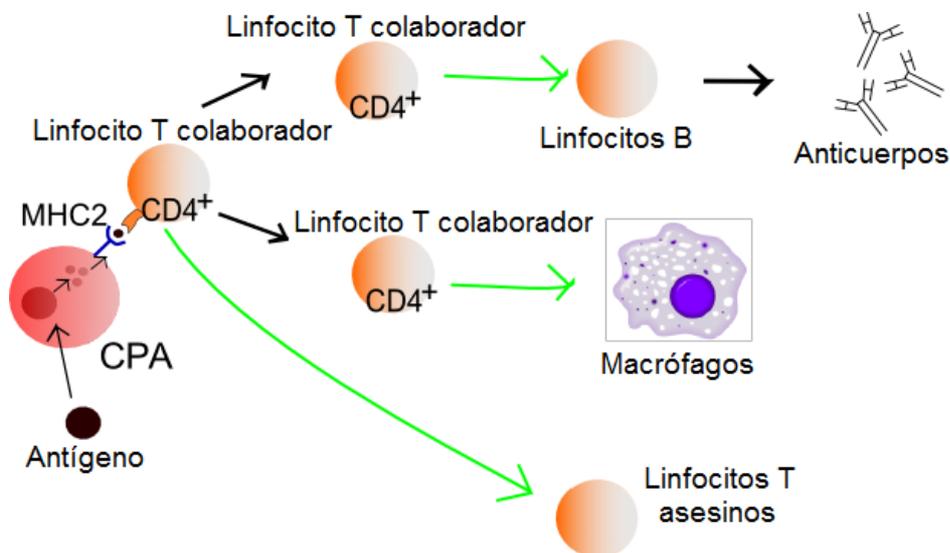
1.6.- MECANISMOS INMUNOLÓGICOS en ALERGIA ALIMENTARIA

La sensibilización alérgica a alimentos es el resultado del fallo en el proceso normal de tolerancia inmunológica que sucede tras el contacto mucoso con los diferentes alérgenos que contienen los alimentos que ingerimos, y que tras ser asimilados en forma de fracciones proteicas o antígenos éstas son reconocidas de forma específica por nuestro sistema inmune.⁷

1.6.1.- Proceso de reconocimiento antigénico

Cuando un antígeno contacta por primera vez con un organismo debe ser procesado por las células presentadoras de antígeno o CPA como los macrófagos, células dendríticas o linfocitos B, para que pueda ser presentado adecuadamente al sistema inmune en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad o CMH clase II. Inicialmente el antígeno es presentado a los linfocitos T, principalmente a linfocitos T CD4⁺ o helper.⁴⁰

Tras el reconocimiento el linfocito T se activa, prolifera y despliega sus funciones efectoras secretando citoquinas y expresando diversas moléculas de superficie que actúan en la amplificación de la respuesta. Estas moléculas estimulan al linfocito B que al activarse secreta las inmunoglobulinas y citoquinas que amplifican aún más la respuesta. A partir de este momento el individuo está inmunizado contra ese antígeno o alérgeno.



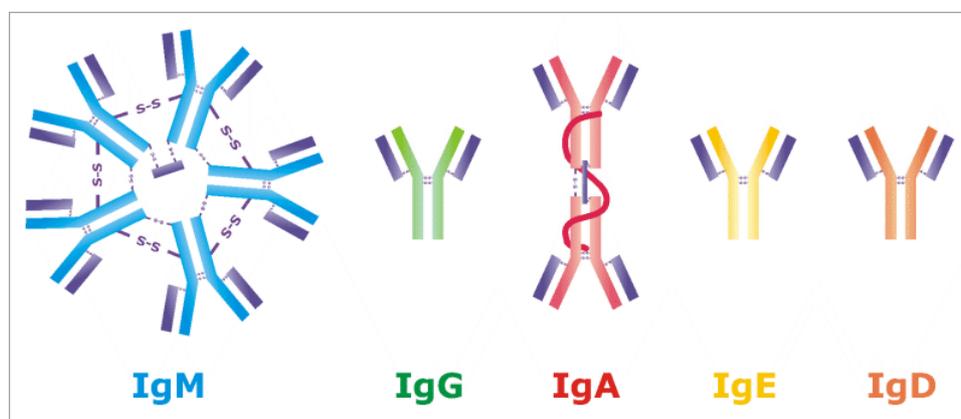
A) Estructura de las Inmunoglobulinas

Todas las inmunoglobulinas comparten la mismas características estructurales presentando una alta variabilidad en aquellas regiones que se unen a los diferentes antígenos. Dicha estructura básica consta de cuatro cadenas peptídicas dispuestas de forma simétrica dos a dos. Cada plano de simetría consta de una cadena pesada y una ligera unidas por puentes disulfuro y enlaces no covalentes. Las dos unidades simétricas están unidas en sus cadenas pesadas por enlaces covalentes y no covalentes.³⁹⁻⁴¹

Las inmunoglobulinas se clasifican en función del orden que aparecen en la electroforesis, y las principales son: tipo A, tipo D, tipo E, tipo G y Tipo M.

Inmunoglobulina	Función biológica
IgM	Fija complemento, opsonización, respuesta primaria, receptor en células B.
IgA	Protección en mucosas, secreción en leche materna, resiste pH digestivo.
IgG	Fija complemento, opsonización, destrucción células NK, atraviesa placenta, inmunidad neonatal, respuesta secundaria.
IgE	Defensa frente a parásitos, anafilaxia, hipersensibilidad tipo I
IgD	Receptor células B (IgD de superficie)

Tabla (modificado de Sanz Larruga y colaboradores): Tipos de Inmunoglobulinas



B) La Inmunoglobulina E

Es una inmunoglobulina monomérica y se encuentra a muy baja concentración sérica. Su principal función la ejerce unida a la superficie de mastocitos y basófilos donde es capaz de inducir reacciones de tipo inflamatorio. Funcionalmente se relaciona con la respuestas de hipersensibilidad de tipo I o inmediata, aunque ejerce un papel principal en la defensa frente a helmintos.⁴⁰⁻⁴¹

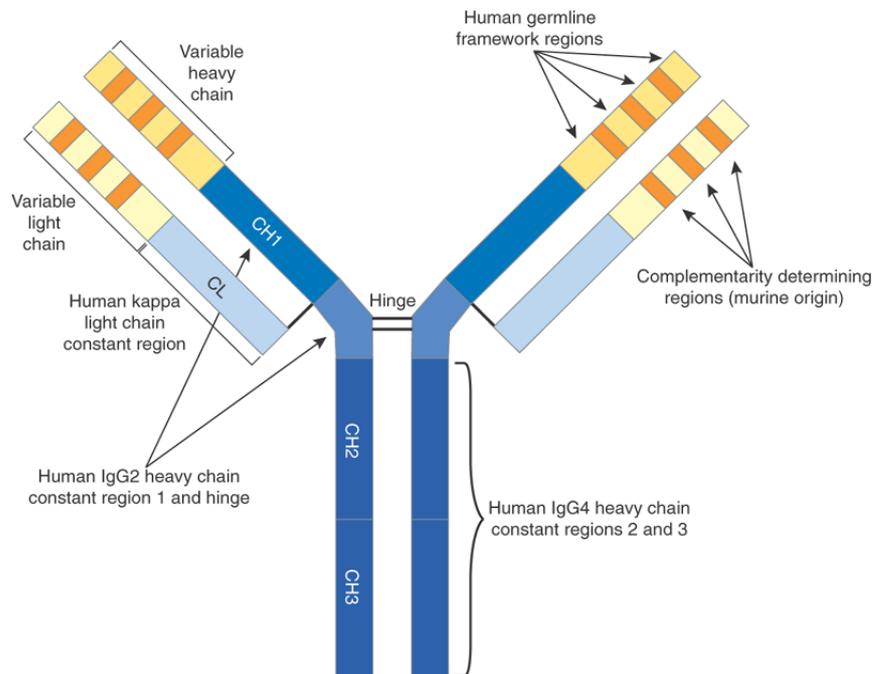


Imagen: Estructura de la Inmunoglobulina E

1.6.2.- Proceso de sensibilización alérgica.

Existen diversos factores asociados en relación con la exposición entre el alimento y el paciente que pueden resultar determinantes para que se produzca o no la sensibilización alérgica, como son:⁴³⁻⁴⁵

- la vía de contacto: oral, cutáneo-mucosa, inhalatoria, etc.
- el estado patológico previo de la mucosa digestiva: infecciones gastrointestinales, isquemia en mucosa digestiva intestinal, erosiones u otros tipos de lesiones en mucosa digestiva, colitis o enteritis.
- las características antigénicas propias del alimento que pueden ser determinantes a la hora de que se produzca o no la tolerancia inmunológica habitual.

La superficie mucosa digestiva dispone de diversos mecanismos por los cuales puede inducir la tolerancia a los alérgenos alimentarios,⁴⁴⁻⁴⁶ no sólo por medio de la generación de linfocitos Treg a través de las células dendríticas, sino que también se ha demostrado que las amígdalas en la cavidad oral son de gran importancia en la formación y mantenimiento de estos linfocitos Treg.⁴⁷

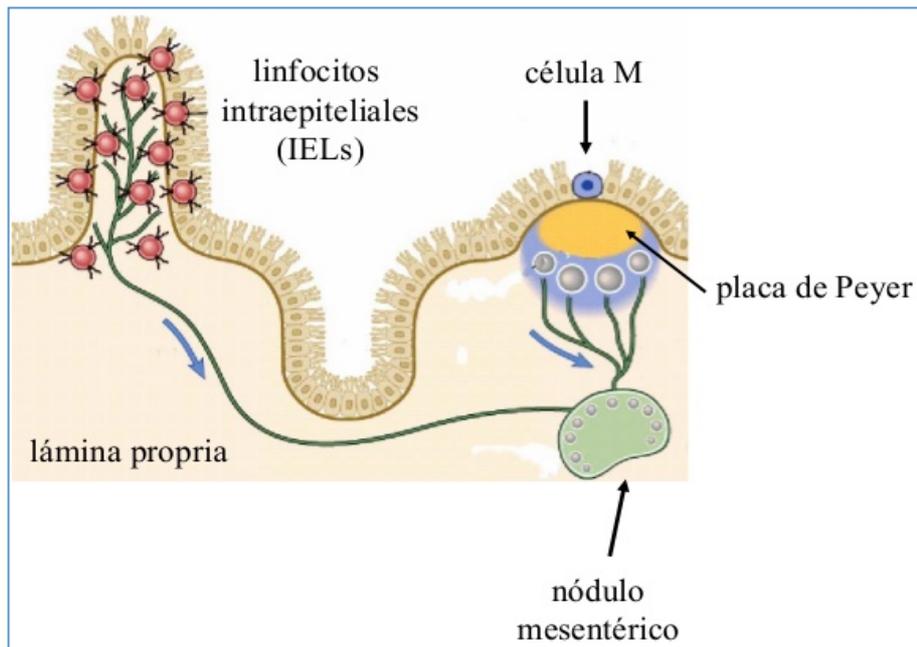


Imagen: Tejido linfoide asociado a mucosa

Las amígdalas son parte del tejido linfoide asociado a mucosa o MALT y por tanto donde los linfocitos T extra-tímicos se pueden desarrollar y tener contacto con los diferentes antígenos alimentarios que entran en contacto con el sujeto, y en este caso antes de ser sometidos a la degradación enzimática del proceso digestivo.⁴⁷⁻⁴⁸

En el tramo intestinal y tras pasar el proceso de digestión enzimática digestiva, los productos alimenticios resultantes son nuevamente procesados y presentados en forma de fracciones al sistema linfóide de la mucosa intestinal o MALT.⁴⁶⁻⁴⁸

Los pacientes que no logran alcanzar inicialmente la tolerancia oral, parece que desarrollan una respuesta inmune de tipo Th2 específica para ese alimento con la consiguiente producción de anticuerpos IgE específicos, responsables del desencadenamiento de la respuesta de hipersensibilidad inmediata y las manifestaciones clínicas de la alergia alimentaria. Una vez establecida la sensibilización primaria, cuando se repite posteriormente el contacto con ese alimento los anticuerpos IgE ya formados se unen a los receptores de alta afinidad o FcεRI en los mastocitos, desencadenando su degranulación y liberación de mediadores como histamina, leucotrienos y prostaglandinas, que ocasionan las manifestaciones clínicas.⁴⁹

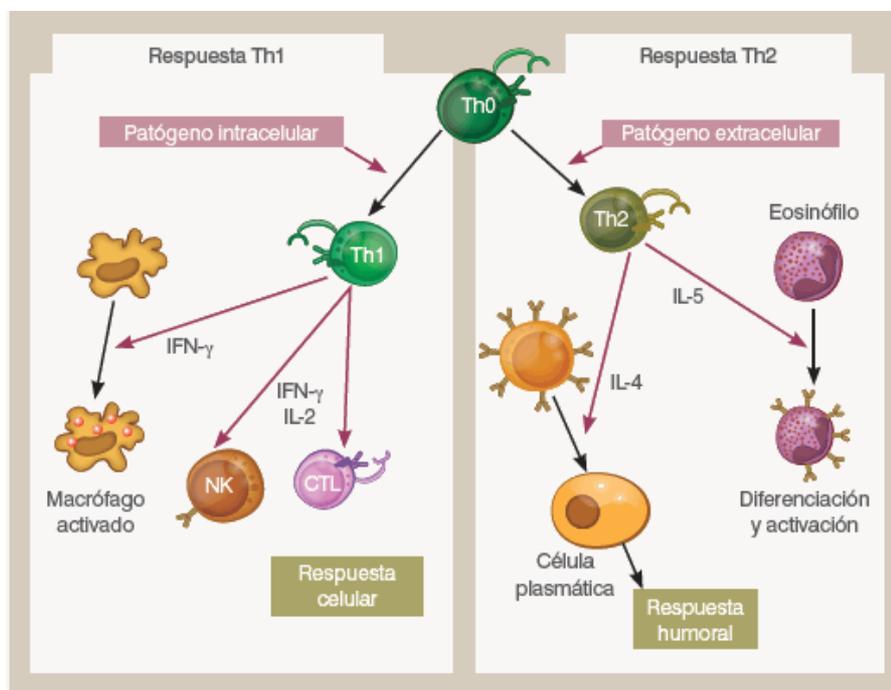


Imagen: Respuesta inmune Th1 y Th2.⁴⁰

Existen de forma innata mecanismos inmunológicos que son reguladores de este tipo de reacción anómala y que suprimen esta respuesta inmunológica fallida cuando se produce el contacto antigénico por vía digestiva. Se han sugerido varios mecanismos favorecedores de esta tolerancia inmunológica a los alimentos, como son:⁵⁰⁻⁵¹

- la delección de linfocitos T específicos de antígeno
- la inducción de anergia en estos linfocitos
- la producción de linfocitos T reguladores que favorecen la vía Th1.

A) Respuesta Th1 y Th2

Durante la presentación del antígeno, el *linfocito Th* o nativo (Th0) se polariza de forma irreversible a las líneas celulares Th1 o Th2, que se distinguen por el perfil de citoquinas que sintetizan y secretan, y que les confiere su función diferenciadora -ver Imagen-.¹³³ La polarización de la célula Th0 es modulada por una serie de factores genéticos e inmunológicos

Las citocinas liberadas por las células Th2 desempeñan un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación alérgica.

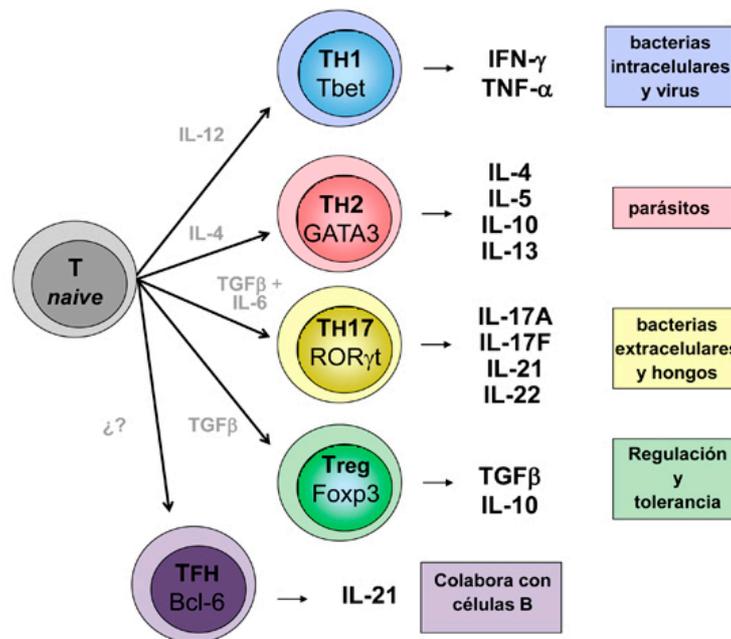


Imagen: Citoquinas implicadas según tipo de respuesta linfocitaria⁴⁰

B) Respuesta inflamatoria alérgica

Los eosinófilos y mastocitos activados liberan pequeñas cantidades de citocinas del perfil Th2 que, aunque insuficientes para iniciar la diferenciación de la célula Th0, sí que consiguen amplificar la respuesta Th2 y contribuyen a la mantener la inflamación.¹³³ Otras citocinas, liberadas preferentemente por monocitos y macrófagos, intervienen en la modulación de la inflamación de la mucosa respiratoria. El paso de los leucocitos circulantes a los tejidos o quimiotaxis se desarrolla a través de la marginación y rodamiento, activación, adhesión al endotelio y migración trasendotelial que resultan de la aparición de distintas moléculas de adhesión en la membrana de células endoteliales y de leucocitos.⁴⁰

La expresión de moléculas de adhesión por el endotelio y los leucocitos es regulada por pequeños péptidos llamados *quimiocinas* que se sintetizan en el foco inflamatorio. Los neutrófilos expresan preferentemente unos receptores que responden con mayor intensidad al estímulo originado por estas quimiocinas, entre las que destaca la IL-8. Por el contrario, los eosinófilos expresan receptores para otras quimioquinas entre las que se encuentran RANTES, eotaxina, MIP o proteína inflamatoria del macrófago, MCP o proteína quimiotáctica del monocito. Cabe destacar el papel de la eotaxina, que actúa específicamente sobre el receptor expresado por eosinófilos y linfocitos Th2 pero no por neutrófilos y es el factor quimiotáctico de eosinófilos más potente conocido hasta la actualidad.¹³⁵¹

La citoquina IP-10 es secretada por diversos tipos de células como monocitos, células endoteliales y fibroblastos en respuesta a IFN-gamma. A esta citoquina (IP-10) se le atribuyen diversas funciones, como factor quimiotáctico para monocitos y macrófagos.

En la inflamación alérgica se produce un reclutamiento selectivo de eosinófilos al foco inflamatorio a través de diversos mecanismos: el aumento de la maduración de eosinófilos en la médula ósea y de su paso a la circulación sanguínea (*IL-5*), en segundo lugar, a través de la expresión endotelial de

moléculas de adhesión tipo P-selectina o VCAM-1 que se unen a receptores expresados preferentemente por eosinófilos, como PSGL-1 o VLA-4, y de la secreción de citocinas y quimiocinas como la IL-4 que favorece la expresión endotelial de P-selectina y de VCAM-1 o la eotaxina. Por último, los eosinófilos extravasados se unen a las proteínas de la MEC a través de la molécula VLA-4 y son estimulados por la IL-5 incrementando su grado de activación y supervivencia.¹³⁴⁻¹³⁶

C) El Mastocito

El mastocito es la célula crucial en la anafilaxia.⁴⁰ Es la célula efectora residente en la mucosa. Estas células se activan mediante mecanismos dependientes y no dependientes de receptores de IgE. Producen y liberan mediadores broncoconstrictores en la urticaria, asma, anafilaxia y la inflamación alérgica. De hecho, la degranulación es prominente en autopsias de muertes por asma.

Los mastocitos asociados a mucosas se correlacionan bien con la severidad de la enfermedad y con la hiperreactividad bronquial,¹³⁴ y su hiperplasia en el músculo liso bronquial,¹³⁵ aunque el número de mastocitos y los niveles de triptasa fallaron en la predicción de la retirada de los ICS en asma.¹³⁶

Existe una gran heterogeneidad en los mastocitos humanos, tanto a nivel cutáneo, tejidos conectivos, y presencia en mucosa y submucosa. Los mediadores liberados por los mastocitos activados incluyen mediadores lipídicos tales como prostaglandinas y leucotrienos, citoquinas tales como IL-1alfa, IL-3, IL-6, IL-10 y TNF-alfa y mediadores preformados tales como histamina, proteoglicanos y serinproteasas.

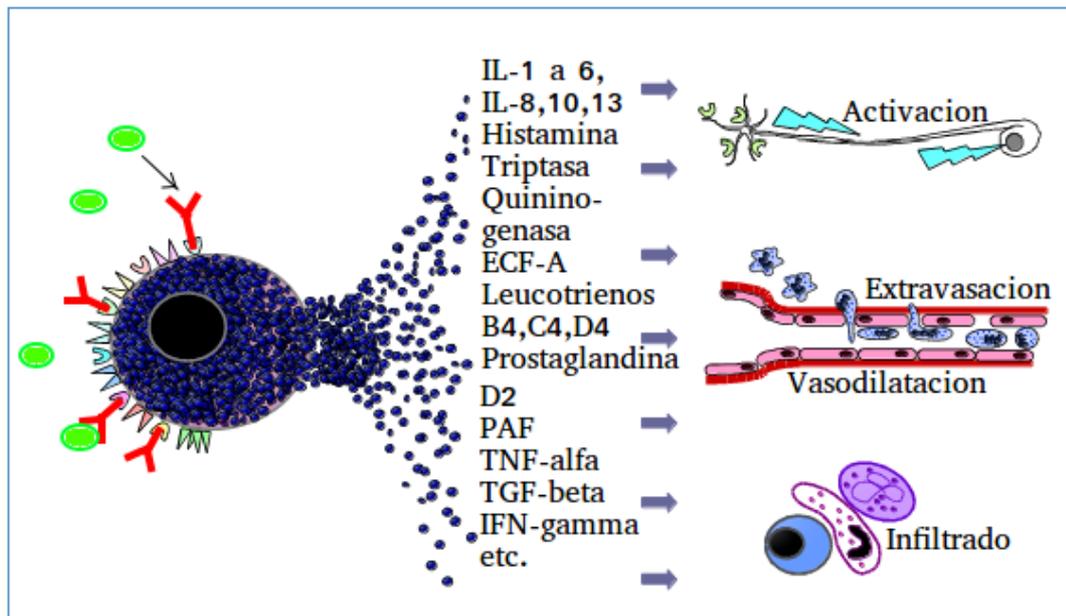


Imagen: Mastocito y sus citoquinas.

Se han descrito hasta 16 tipos de proteasas granulares neutras liberadas por las mastocitos murinos. De ellas podemos destacar:

- las **quimasas**: mMCP-1, mMCP-2, mMCP-3/4L, mMCP-4, mMCP-5, mMCP-8, mMCP-9, mMCP-10, Granzyme B, Cathepsin G.
- las **triptasas**: tales como mMCP-6, mMCP-7, mTMT/Tryptase γ /Prss31, mMCP-11/Prss34.
- las **exopeptidasas** tales como mCPA3.
- Las **calicreínas** tales como la neuropepsina.

La importancia de estas proteínas se han demostrado mediante su correlación con los episodios de anafilaxia,¹³⁷ así como la demostración de los niveles de PAF elevados en los episodios de anafilaxia por medicamentos, picadura de himenópteros o ingestión de alimentos.^{138,139}

1.6.3.- Reacciones de hipersensibilidad.

El término de *hipersensibilidad* se ha utilizado para describir la excesiva o inadecuada respuesta inmunitaria frente a determinados antígenos externos, y que causa una inflamación tisular con alteración funcional.⁴⁰

En 1975, Gell y Coombs⁴² clasifican las reacciones de hipersensibilidad en cuatro tipos, de I a IV, según los mecanismos celulares y humorales implicados. Según el mecanismo variaba el tiempo de reacción tras el contacto con el antígeno y la clínica que desarrolla el sujeto, pudiendo variar en intensidad de reacciones leves hasta sistémicas graves, y en extensión, desde reacciones locales como dermatitis hasta sistémicas como anafilaxia -ver Clínica en Introducción-.

Reacciones de hipersensibilidad				
Tipo	Nombre	Mecanismo	Latencia	Mediadores
I	Inmediata	IgE	15 min	Histamina, LTCA
II	Citotóxica	IgG o IgM	-	C o ADCC
III	Inmunocomplejos	IgG	5-6 h	C5a, proteasas
IVA	Retardada	Linfocitos T	> 24 h	Linfocinas (IFNg y otros)
IVB	-	Linfocitos Tc	-	Citotoxicidad

IgE: inmunoglobulina E. IgM: inmunoglobulina M. LTCA: leucotrieno CA.
C: complemento. ADCC: proceso de citotoxicidad dependiente del anticuerpo.
C5: anafilotoxina. IFNg: interferón gama.

Tabla: Clasificación de Gell y Coombs (1975)

1.6.4.- Factores angiogénicos y Alergia

En los años 70, el factor activador de plaquetas o PAF fue el primero en ser vinculado con la respuesta alérgica ligada a la IgE.¹⁴⁰ Este factor PAF ha sido recientemente definido como un importante mediador inmunológico que juega un papel principal en la respuesta alérgica y que se correlaciona con la severidad de la reacción anafiláctica.¹⁴¹

En la misma línea, se ha asociado este factor PAF con el uso de la adrenalina, tratamiento principal y básico de la reacción anafiláctica, en el estudio de las células musculares tras ser estimuladas tras la administración de adrenalina.¹⁴²

En general, la angiogénesis es un proceso complejo controlado por el equilibrio entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos, como vemos en la tabla, que pueden coexistir en el mismo tejido. Estos factores pueden ser circulantes o actuar localmente como factores paracrinos.

Factores proangiogénicos	
Factor	Función biológica
VEGF	↑ permeabilidad, ↑ activadores del plasminógeno, ↑ colagenasas intersticiales, proliferación y migración de las CE, ↓ apoptosis CE
FGF	↑ proliferación y migración de las CE, ↑ activadores del plasminógeno, ↑ integrinas $\alpha_v\beta_3$ y otras moléculas de adhesión
Ang-1	Formación de los brotes vasculares y estabilización de los vasos
Ang-2	↑ proliferación y migración de las CE, formación de los brotes vasculares en presencia del VEGF
PDGF	Estabilización de los vasos
TGF β	Estabilización de los vasos
TNF α	Migración CE
EGF	Proliferación CE
CSFs	Proliferación y migración CE
Angiogenina	Proliferación CE
Angiotropina	Migración CE, formación del tubo
IGF-1	Proliferación CE, ↓ apoptosis CE, inducción del VEGF, ↑ activadores del plasminógeno
HGF	Proliferación y migración CE
PECAM-1	Agregación CE, formación tubo, migración CE, estabilización tubo, angiogénesis inducida por FGF
Integrinas	Adhesión CE, migración CE, ↓ apoptosis CE, angiogénesis inducida por FGF
Óxido nítrico	↑ permeabilidad, proliferación CE, liberación FGF

Tabla: Factores proangiogénicos

Hay 2 tipos de factores estimuladores de la angiogénesis:

a) *Factores específicos*, liberados por numerosos tipos celulares, que se unen de forma específica a los receptores de las células endoteliales, destacando el factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF y las angiopoyetinas

b) *Factores inespecíficos*, que se unen a las células endoteliales pero también a otras células, son numerosos y afectan al crecimiento de la célula endotelial y de otras muchas. Algunos de los más importantes son los factores de crecimiento de fibroblastos –FGF–, el factor de crecimiento transformante –TGF α –, el factor de crecimiento epidérmico –EGF–, el factor de crecimiento derivado de plaquetas –PDGF–, etc.¹⁴³

El VEGF es la molécula mejor caracterizada y más importante del proceso angiogénico. Se han descrito 6 isoformas del VEGF que difieren en sus propiedades y funciones. Los 2 principales receptores son expresados en las células endoteliales cuando se encuentran en fase de proliferación. La unión del VEGF con sus receptores activa diversas vías de señal que intervienen en diferentes pasos en la angiogénesis. Así, el VEGF contribuye a la vasodilatación inicial, aumenta la permeabilidad de las células endoteliales, estimula la proliferación y migración de las células endoteliales y disminuye la apoptosis.

Estudios recientes apuntan que los eosinófilos de sangre periférica pueden ser inductores de angiogénesis¹⁴⁴ y que el factor VEGF podría jugar un importante papel en esta angiogénesis, y por tanto en remodelado de la vía aérea en el asma bronquial¹⁴⁵ y en diferentes fenotipos de asma.¹⁴⁶

El factor de crecimiento derivado de plaquetas o PDGF es sintetizado principalmente por las plaquetas y se encuentra contenido de sus gránulos, pero también se ha demostrado que es liberado por macrófagos activados.¹⁴⁷

Podemos comprender como el proceso angiogénico no está producido por una sola molécula o familia de moléculas, sino que depende de la cooperación e integración de varios factores que contribuyen a la proliferación, migración, invasión y diferenciación de la célula endotelial.

1.7.- HISTORIA NATURAL DE LA ALERGI A ALIMENTARIA

En la historia natural de la alergia alimentaria, de forma general, se considera que cuando una paciente se sensibiliza a un alimento, debido a las características propias del sistema inmune, esta alergia se considera que va a ser persistente en el tiempo.¹⁻⁴ Por el contrario, cuando esta sensibilización ocurre en la primera infancia, debido a las características del sistema inmune del niño aún inmaduro, existe una alta probabilidad de que esta sensibilización desaparezca de forma espontánea realizando una dieta restrictiva y evitando el alimento responsable de la sensibilización durante un tiempo prolongado, variable según cada paciente.⁵²⁻⁵³

Por este motivo, la alergia a alimentos en los niños se considera que tiene mejor pronóstico, y algunos alimentos como la leche y el huevo, que son las causas más frecuentes de alergia alimentos a esta edad,^{5,10} cuentan con un buen pronóstico de resolución inicialmente si se realiza una dieta correcta. En las principales series prospectivas de pacientes se ha estimado que siguiendo una dieta restrictiva del alimento se consigue la tolerancia de forma espontánea en un tiempo que suele oscilar entre 1 y 4 años, con un porcentaje de resolución del 75-85% a los 4 años.^{1-4,53-57}

Pero en el 10-15% restante de los pacientes que no lo superan a esta edad, la sensibilización alimentaria empeora su pronóstico y se considera que a partir de esos momento es poco probable que la alergia alimentaria ceda espontáneamente.⁵³⁻⁵⁷ Estos pacientes son los que son diagnosticados de alergia alimentaria persistente y carecen de otras opciones salvo continuar la dieta de eliminación .

Se ha intentado identificar cuales son los factores que marcan el pronóstico de la sensibilización para que ésta evolucione hacia la curación o hacia la persistencia.⁵⁸⁻⁵⁹ Se ha estudiado diversos aspectos que se relacionan con la pérdida de reactividad clínica, como el tamaño y reactividad de la prueba cutánea o los niveles séricos de IgE específica a leche. Pero los hallazgos son heterogéneos y no se han confirmado con posterioridad, por lo

que no hay unanimidad a la hora de determinar si existe o no un punto de corte definitorio del pronóstico.

En estos pacientes se ha visto necesario la búsqueda de algún tipo de tratamiento que modificara el curso de la enfermedad, ya que la completa evitación de alimentos tan cotidianos como la leche y el huevo suponen una tarea difícil de llevar a cabo de forma estricta. Esto es debido a su alta ubicuidad no sólo en alimentos derivados, como nata, yogurt, queso, etc, sino también como componente minoritario en otros alimentos, embutidos, cremas, galletas, biscochos, etc, o como elementos trazables o traza en cereales, productos de repostería, alimentos envasados diversos, etc.

	Yoghourt	Quesitos	Crema de Queso	Mantequilla
Valor Energético	58 Kcal	240 Kcal	240 Kcal	742 Kcal
Proteínas	3,2 gr	11 gr	5,0 gr	0,6 gr
Hidratos de C.	4,0 gr	4,6 gr	3,0 gr	0,4 gr
Grasas	2,9 gr	19,50 gr	23,0 gr	82 gr
Saturadas	1,8 gr	12,5 gr	15,0 gr	55,3 gr
Monoinsaturadas	0,89 gr			24,4 gr
Poliinsaturadas	0,07 gr			2,2 gr
Calcio	125 mg	680 mg		
Fósforo	102 mg			
Sodio	0,05 gr	0,9 gr	0,4 gr	0,01 gr
Fibra	0	<0,1 gr	0,2 gr	0

Tabla: Composición de la leche y algunos derivados¹²

Debido a que la lista de alimentos y productos a evitar es tan amplia, es una labor muy intensa de control la que debe llevar la familia y el paciente, y los accidentes que pueden ocurrir por ingestas inadvertidas son relativamente frecuentes, que en muchos casos producen síntomas graves llegando en ocasiones a reacciones fatales.⁶⁰

1.8.- ANTECEDENTES HISTORICOS EN DESENSIBILIZACION ALIMENTARIA.

En los años 80 aparecieron publicados en la literatura médica diversos trabajos que estudiaban el uso de determinados protocolos de *desensibilización alérgica con alimentos* en los que basándose en los conocimientos previos de desensibilización alérgica en pacientes con otro tipo de alergias, como alergia respiratoria a inhalantes, alergia a medicamentos, o alergia a himenópteros,⁸⁵⁻⁸⁸ y se ha intentado aplicar en pacientes con alergia alimentaria.

En Italia algunos autores⁶¹ comenzaron proponer la introducción paulatina del alimento como método terapéutico para inducir una hiposensibilización en el paciente y lograr de esta forma la inducción de tolerancia progresiva a dosis cada vez mayores, aunque siempre enfocado hacia el efecto protector ante reacciones por contactos accidentales con alimento, y de duración siempre dependiente de la dosis.

A finales de los 90 en Estados Unidos se publicó un trabajo realizado en pacientes con alergia al cacahuete,⁶² a los que se le administró una vacuna realizada con extracto de cacahuete en inyecciones subcutáneas. Se administraban concentraciones progresivas del alérgeno, al modo de las vacunas alérgicas utilizadas en el tratamiento de la alergia respiratoria a diferentes inhalantes, como hongos, pólenes, ácaros, etc.

Algunos de los pacientes respondieron de forma positiva y lograron aumentar la dosis umbral de tolerancia al cacahuete. Sin embargo, en algunos pacientes estas vacunas produjeron varias reacciones adversas, alguna de ellas graves, de manera que el balance riesgo/beneficio no se consideró satisfactorio y por lo tanto no parecía un tratamiento válido como alternativa terapéutica en estos pacientes.^{62,63}

Poco después la aparición de nuevos protocolos de desensibilización alimentaria, fundamentalmente para pacientes alérgicos a leche utilizando la vía oral, destacaron en sus resultados cómo se lograba igualmente una buena respuesta clínica del paciente pero con mejor tolerancia que en estudios previos, lo que hacía pensar que esta vía de administración oral era la más adecuada para lograr el efecto esperado sin riesgo para el paciente.⁶⁴⁻⁶⁵ Estos alentadores resultados produjeron en los siguientes años una corriente de interés renovado por este tipo de terapias, y varios grupos de investigación publicaron nuevos protocolos de desensibilización con leche de vaca que fueron optimizando el procedimiento, mejorando la duración mediante pautas más cortas así como los resultados obtenidos.⁶⁶⁻⁷²

Dentro de estos grupos de investigación destacan algunos equipos europeos que cuentan con una larga experiencia, con resultados muy esperanzadores en series largas de pacientes que han aportado una base importante de conocimientos sobre la inmunoterapia oral como alternativa terapéutica válida.⁷³⁻⁷⁴

Aunque la mayoría de los primeros estudios clínicos se centran fundamentalmente en la leche, posteriormente se ha ido extendiendo hacia otros alimentos, como el huevo,^{75,76} y otros con los que se tiene aún menos experiencia más excepcionalmente con otros alimentos como la avellana.^{77,78}

La tasa de éxito o finalización completa de este tratamiento aunque variable según los grupos, se considera ya como un éxito alcanzar el objetivo de la tolerancia completa del alimento, unos 200ml de leche o un huevo completo por ejemplo, y se puede considerar beneficioso también la tolerancia parcial, ya que en estos pacientes disminuye el riesgo de reacciones graves con ingestas inadvertidas o contactos accidentales. En las primeras series de pacientes los autores apuntaban que la tasa de éxito podía ser de un 71,4%⁶⁷ hasta un 76,9%⁶⁶, lo cual impulsó a más grupos de investigación a continuar con estudiando este tipo de terapias.

1.9.- MECANISMOS BASICOS EN DESENSIBILIZACION e INMUNOTERAPIA ALIMENTARIA

La inmunoterapia con alimentos es un procedimiento terapéutico dirigido hacia la modulación de esta respuesta anómala del sistema inmune hasta alcanzar la tolerancia natural al alimento.⁵²⁻⁵⁴ El objetivo del tratamiento sería alcanzar la tolerancia no sólo clínica sino inmunológica de forma permanente, incluso una vez que finaliza el tratamiento y el contacto regular forzado diario según la pauta del procedimiento. Esto permitiría poder llevar una dieta libre sin riesgos ante el contacto con cualquier cantidad de alimento aunque el consumo fuera ocasional.

Sin embargo, durante la inmunoterapia alimentaria lo que primero se observa es una *hiposensibilización* o desensibilización progresiva del paciente, es decir que disminuye la respuesta clínica en contactos posteriores con ese alimento.⁷⁹ Este efecto modulador suele depender de la duración de la terapia y persiste mientras el paciente mantiene el contacto regular con el alimento, pero existen pocos estudios que demuestren la persistencia de esta protección si se interrumpe el contacto con el alimento de forma prolongada y luego se vuelve a introducir en la dieta,⁸⁰⁻⁸² y en algunos casos se ha demostrado que pueden existir recaídas con aparición de reacciones adversas secundarias al alimento si se suspende de forma temprana la terapia.⁸³

Este procedimiento inicialmente llamado *desensibilización* o *inducción oral de tolerancia* es una alternativa terapéutica que ya se utiliza con fármacos de diferentes tipos, como antibióticos o quimioterápicos, con unas tasas de éxito muy alentadoras,⁸⁴⁻⁸⁵ y que permiten el uso de dichos fármacos en pacientes sensibilizados si lo precisaran. De esta forma, por mecanismos inmunológicos que implican al proceso de reconocimiento antigénico entre las proteínas y los anticuerpos o receptores celulares, así como forzando este contacto a las dosis y frecuencia marcadas, se logra evitar la respuesta clínica alérgica y alcanzar la tolerancia clínica de una cantidad cada vez mayor del alérgeno.⁸⁶

Se considera, entonces, que el paciente ha conseguido la *tolerancia clínica* y puede utilizar el alimento/medicamento con normalidad, a pesar de que inmunológicamente siga estando sensibilizado, es decir siguen existiendo IgE específica en el organismo. Lo que se espera en la inmunoterapia alimentaria es que el mantenimiento a largo plazo de este contacto con el antígeno modifique esta sensibilización de forma definitiva (memoria inmunológica), y en ese momento es cuando se considera que el procedimiento actúa no sólo con efecto de *desensibilización* sino de *hiposensibilización* estable de forma similar a la inmunoterapia convencional con alérgenos respiratorios.⁸⁷

Los mecanismos básicos por los cuales la inmunoterapia alérgica modifica la respuesta inmunológica de hipersensibilidad hacia la de *tolerancia* inmunológica y posteriormente tolerancia clínica, no se conocen con exactitud pero la formación de linfocitos T reguladores (Treg) parece crítico para el éxito del tratamiento.⁸⁸⁻⁸⁹ Parece probable que se logre a través de la modificación de la respuesta de hipersensibilidad de tipo Th2 hacia una respuesta de tipo Th1, lo cual se podría alcanzar con la supresión de células efectoras como mastocitos y basófilos, descenso de linfocitos T específicos con la consiguiente reducción de anticuerpos IgE específicos, formación de IgG4 específicos,⁹⁰⁻⁹¹ y por la producción y expansión de células T reguladoras que ocupan un lugar principal en esta modulación de respuesta,⁹²⁻⁹³ al ser capaces de obtener la inmunosupresión o anergia a través de diversos mediadores solubles o moléculas de superficie, destacando la secreción de IL-10 y TGF- β .⁹⁴

Basándose en estos hallazgos, en el seguimiento de los pacientes con inmunoterapia oral con alimentos se han evaluado diversos métodos para medir esta modificación de la respuesta inmunológica, desde la valoración del tamaño de la prueba cutánea en prick con el alimento, hasta la determinación de los valores serológicos de diferentes marcadores biológicos que indiquen si existe respuesta o no al tratamiento.⁶⁴⁻⁷⁴ Estos incluyen entre otros la actividad de basófilos, los niveles de IgE e IgG4 específicos y de Ig A salivar, así como el estudio de las células T reguladoras como veremos a continuación.

La modulación de las células efectoras de la respuesta alérgica medido a través de las pruebas cutáneas en prick o el test de activación de basófilos, ha obtenido resultados variables. Tanto los mastocitos como los basófilos quedan en estado de anergia durante la inmunoterapia al ser degranulados progresivamente o inhibidos por las células T reguladoras. Sin embargo, se ha observado que la respuesta cutánea medida por el prick test en algunos casos disminuye^{73,95} mientras que en otros no se observa este cambio de respuesta comparado con placebo.⁷⁰

Algunos estudios sitúan al basófilo como pieza central del proceso de desensibilización, y el descenso en la expresión de marcadores de activación de basófilos, concretamente el CD63,⁹⁶ se ha postulado como posible marcador de hiposensibilización en pacientes con inmunoterapia con alimentos⁹⁷⁻⁹⁹ y se ha podido relacionar con el descenso de expresión de Syk, una enzima tipo tirosin-quinasa que actúa como parte transcendental en el proceso de liberación de histamina.¹⁰⁰

El test de activación de basófilos ha demostrado resultados variables, con descenso en algunos casos¹⁰¹ o sin modificaciones significativas en otros¹⁰² aunque estas diferencias parecen estar explicadas por el diferente tipo de muestra utilizada.

La expresión de CD203c en los basófilos aumenta de forma precoz durante la inmunoterapia, el cual ha sido vinculado con inflamación en pacientes que presentan cifras elevadas y en correlación con los estudios que lo asocian a exacerbaciones de asma.¹⁰³ Ambos marcadores de basófilos suelen estar correlacionados y su ascenso temprano durante la inmunoterapia se ha relacionado con una peor evolución durante el proceso de hiposensibilización, posicionándose como posibles marcadores de respuesta clínica¹⁰⁴

En los pacientes que se reciben inmunoterapia oral con alimentos se ha demostrado descenso significativo de niveles de IgE específica comparado con los niveles basales⁶⁶⁻⁷⁰ aunque no alcanzan por lo general la negativización

completa, en oposición con el incremento gradual de IgG4 específica que suele asociar. Este cambio en el ratio IgE/IgG4 específicas se hará más significativo cuanto más prolongado sea el tiempo de tratamiento.^{101,71-73} Los niveles bajos de IgE específica se asocia con un descenso en los valores de histamina liberada pero aún no queda claro su relevancia clínica¹⁰⁵ ni su posible uso como marcador de éxito de la desensibilización alimentaria.

La mayor parte de las series han constatado que los niveles de IgE específica en general tienden a descender comparados con los niveles basales que presentan los pacientes antes de iniciar el tratamiento,⁶⁴⁻⁶⁷ pero esto no siempre sucede en todos los pacientes, y se ha llegado a relacionar la falta de respuesta inmunológica o de descenso de la IgE específica como posible marcador de riesgo de fracaso de la inmunoterapia⁶⁸ o de resistencia a la desensibilización con mayor riesgo de reacciones adversas durante el proceso.

Esto ha llevado en algunas series de casos ha estudiar cómo se comportan estos pacientes a largo plazo,⁶⁸ y tras un periodo de seguimiento variable sometidos a terapia de desensibilización alimentaria, se les vuelve a indicar que sigan una dieta de evitación de 2 meses de duración para dicho alimento, para finalmente realizar una provocación oral alimentaria con leche. Se intenta valorar de este modo si la mejoría del grado de sensibilización alérgica es persistente o depende del mantenimiento de contacto diario de la dosis del alimento, y comprobar por tanto si se puede considerar que la tolerancia obtenida es completa y definitiva.

Según este autor,⁶⁸ se pueden distinguir cuatro grupos de pacientes en función de la evolución observada:

- *grupo I o respondedores*, con buena tolerancia final al alimento tras la dieta restrictiva.
- *grupo II o respondedores transitorios*, con buena tolerancia inicial pero que tras la evitación volvían a manifestar síntomas al reintroducirlo.

- *grupo III o respondedores parciales*, que sólo alcanzan dosis parciales del alimento durante la desensibilización y no llegan a alcanzar la dosis máxima, y
- *grupo IV o no respondedores*, que no consiguen buena tolerancia ni siquiera a dosis parciales y abandonan la terapia por reacciones adversas no controlables.

Por otro lado, la elevación progresiva y significativa de la IgG4 específica se considera de importancia en el seguimiento de estos pacientes por la capacidad de estos anticuerpos de competir con la IgE en la unión al alérgeno y suprimir la degranulación secundaria de mastocitos y basófilos,⁴⁰ y por actuar de coligando con FcεRI y FcγRIIB. Sin embargo, estos niveles elevados de IgG4 específica no se ha podido correlacionar aún con la completa resolución del proceso, es decir, con la obtención de la tolerancia clínica permanente.

Se ha hallado relación entre el aumento de los linfocitos T reg CD4+CD25+FOXP3+ y el fin de la desensibilización alimentaria, postulándose como marcador de tolerancia clínica¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ pero aún no se considera confirmado y sería necesario que se midiera en más series de pacientes. En esa misma línea se ha comprobado que en pacientes alérgicos alimentos los valores basales de linfocitos B CD27+ CD35+ y de células dendríticas TGF-β+ son significativamente inferiores que en pacientes sanos, los cuales tras la inmunoterapia incrementan progresivamente su valor, siendo estas células dendríticas TGF-β+ o “tolerogénicas” las que inducirán la formación de linfocitos T reg CD4+CD25+Foxp3+.¹⁰⁸

2.- OBJETIVOS

El propósito del presente trabajo se puede resumir con los siguientes objetivos:

2.1.- Objetivos principales:

1.1.- Determinar si la desensibilización alimentaria es un método válido como procedimiento terapéutico en la pacientes con alergia grave a proteínas de leche de vaca.

1.2.- Evaluar los diferentes patrones de respuesta clínica e inmunológica durante el procedimiento de desensibilización alimentaria.

1.3.- Determinar qué tipo de marcadores biológicos o biomarcadores pueden ser útiles en el seguimiento evolutivo de pacientes tras la desensibilización alérgica a leche.

2.2.- Objetivos secundarios:

2.1.- Conocer las características poblacionales generales de los pacientes alérgicos a leche grave.

2.2.- Caracterizar clínicamente los diferentes tipos de reacciones adversas durante la desensibilización con leche de vaca .

2.3.- Determinar la seguridad y eficacia de este procedimiento de desensibilización alimentaria con leche a corto y largo plazo.

3.- MATERIAL Y METODOS:

3.1.- MATERIAL

3.1.1.- CONSULTA DE ALERGOLOGIA

El presente estudio se ha realizado en su totalidad en las consultas de la policlínica de Alergología situadas en el Hospital del Tórax-Ofra en Santa Cruz de Tenerife, responsable de la asistencia sanitaria de los pacientes que pertenecen al Área de Salud de la zona Norte de la Isla de Tenerife, con unos 500.000 habitantes aproximadamente, incluyendo tanto población adulta como pacientes en edad pediátrica.

La Unidad de Alergología del Hospital del Tórax-Ofra comprende la siguiente dotación de recursos:

A.- Zona de POLICLINICA: es la zona donde se reciben los pacientes y se realiza la primera valoración. Está formada por:

A.1.- Mostrador de recepción de pacientes: donde el personal auxiliar clínico recibe al paciente y acompañantes, comprueba la consulta en la que está citado, se abre historia clínica física, se entrega una hoja informativa sobre el funcionamiento de la policlínica y se le dirige a la sala de espera.

Dispone de una sala anexa que se utiliza como *archivo* temporal de las historias clínicas que están siendo utilizadas en ese momento en la policlínica, así como de almacén de todo el material de papelería que necesita la consulta par su funcionamiento diario: papel, carpetas, sobres, bolígrafos, impresos hospitalarios, cartuchos de impresora, etc.

A.2.- Consultas médicas: 4 despachos de consulta donde se realiza la historia clínica y la exploración física, que contienen la mesa de despacho con equipo informático para registrar la historia clínica del paciente, y camilla articulada de exploración para examinar al paciente dotada de rino-otoscopio

manual, fonendoscopio y negastoscopio. Dispone de lavabo de manos para la adecuada higiene de manos.

A.3.- Sala de pruebas complementarias: donde se realizan la mayor parte de los procedimientos diagnósticos habituales en alergia, como son las pruebas cutáneas -Ver Métodos. Está equipada con 6 sillones reclinables y mesas con bandeja ajustable en altura donde se apoya el paciente para la realización de las pruebas cutáneas o la extracción de muestras de sangre. Está equipado con 2 neveras donde se conservan los extractos que se utilizan para las pruebas cutáneas así como un arcón congelador para la conservación de muestras biológicas.

También dispone de una sala anexa donde se realizan las pruebas funcionales respiratorias, dotado con toma de oxígeno centralizada en pared, un espirómetro/rinómanómetro (Jaeger®, Alemania) con dosímetro para pruebas respiratorias diagnósticas en asma y rinitis, como rinomanometría, espirometría, prueba broncodilatadora, provocación bronquial inespecífica y específica. Tiene software especializado correspondiente (Labmanager® 4.0, Alemania) que permite el análisis de resultados y comparativas con registros previos del paciente.

A.4.- Sala de espera: espacio dotado de sillas para unas 25 personas, con televisor de 20 pulgadas y aseo de uso público. La sala dispone de calefactor y ventiladores de pared para acondicionamiento de la temperatura según la época del año.

B.- Zona de TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS: es la parte de la consulta habilitada para la administración de inmunoterapia hiposensibilizante. Abierta diariamente en horario de 8:30 a 10:30 a.m. para la administración de vacunas en pauta de iniciación o en pacientes de alto riesgo, como pacientes clínicamente inestables, alérgicos a himenópteros, embarazadas. Se presta asistencia a 30 y 50 personas al día aproximadamente.

El personal de enfermería valora el estado del paciente, comprueba que se encuentra estable se su patología alérgica y no presenta contraindicaciones en ese momento para ser vacunado, como fiebre, exacerbación asmática reciente, etc, y administra la dosis correspondiente a ese día. El paciente debe permanecer 30 minutos en la sala de espera en observación. La zona de espera está situada enfrente para poder observar la evolución de los pacientes, y está dotada de asientos para unas 15 personas.

En esta sala también se administran tratamientos parenterales especiales, como los anticuerpos monoclonales. Actualmente a esta unidad acuden los pacientes que reciben tratamiento con Omalizumab (Xolair®), de dispensación hospitalaria, donde son citados según el régimen de administración pautado quincenal o mensualmente, y permanecen en observación en la unidad durante treinta minutos.

Esta sala dispone de un puesto de enfermería dotado de todo el material sanitario necesario: jeringas con aguja hipodérmica, algodón, solución higienizante, guantes, contenedor para desechos sanitarios, etc.

También dispone de camilla, toma de oxígeno centralizado con mascarilla y nebulizador, tensiómetro, pulsioxímetro, pie regulable para sueroterapia, así como toda la medicación precisa para tratar una eventual reacción adversa a la administración del tratamiento biológico según protocolo - Ver Anexo-.

C.- Unidad de ALIMENTOS y MEDICAMENTOS: Pruebas especiales

En esta zona se realizan los procedimientos específicos para el diagnóstico de alergia a alimentos o medicamentos, concretamente las técnicas específicas que precise cada paciente para confirmar o descartar el diagnóstico, como son la provocación oral abierta, o en simple ciego o doble ciego -Ver METODOS-, así como los procedimientos de desensibilización -Ver METODOS- en los casos que se precisara.

La sala está dotada de sillones reclinables para 8 pacientes así como sillas para el acompañante, importante en el caso de los niños. Dispone de una cama hospitalaria articulada y regulable, con toma de oxígeno de pared con mascarilla y nebulizador, así como tensiómetro, pulsioxímetro y toda la medicación precisa para tratar una posible reacción adversa durante la realización de los procedimientos según protocolo -Ver Anexo -.

En la zona de entrada a esta sala se sitúa el carro de parada, por considerar que esta zona es la más accesible por si es necesario utilizarlo en cualquier otra sala de la unidad. Por protocolo debe estar ubicado en un lugar fácilmente accesible, que permita su traslado donde se necesite, y todo el personal de la unidad conoce su ubicación y está adiestrado en su uso.

Este carro de parada está dotado con todo el material necesario para realizar la reanimación cardiopulmonar: Ver Anexo

- monitor electrocardiográfico.
- palas de desfibrilador.
- laringoscopios de adulto y niños.
- material fungible: guantes, sondas, tubos orofaríngeos, catéteres, sondas, jeringas, etc.
- medicación: toda la recogida en el protocolo

En la zona de entrada a la unidad hay un puesto de control de enfermería donde se registran las historias clínicas que están esos días realizando algún procedimiento en la unidad así como un archivo. También tiene un armario donde se almacenan los fármacos que se utilizan para los procedimientos de diagnóstico a medicamentos.

Para los alimentos de los procedimientos existe una nevera donde se guardan de forma provisional todos los productos alimenticios que serán utilizados esos días. Al lado de esta nevera existe una mesa, fuera de la sala de los pacientes, donde el personal de enfermería manipula y procesa los alimentos, y prepara los placebos para las provocaciones que se precisen, como en simple ciego y doble ciego.

D.- RECURSOS HUMANOS

La Unidad de Alergia del Hospital del Tórax está formada por un equipo de profesionales sanitarios y administrativos de diversas categorías:

D.1.- Médicos especialistas: Formado por 4 Alergólogos. Cada especialista tiene asignada una consulta de policlínica 4 días a la semana, y es el responsable de supervisar la Unidad de Alimentos y Medicamentos 1 vez a la semana. Cada médico es responsable de las vacunas que ha prescrito a los pacientes cuando éstos acuden a la unidad de Vacunas.

D.2.- Enfermería: Dispone de 3 DUE o diplomado universitario de enfermería. En la sala de pruebas complementarias hay 1 DUE realizando las pruebas cutáneas. En la sala de vacunas hay 1 DUE que también es el responsable de las pruebas funcionales respiratorias. En la Unidad de Alimentos y Medicamentos hay 1 DUE realizando los procedimientos específicos.

D.3.-Auxiliar clínico: 1 auxiliar, que funciona de apoyo para Enfermería y recibe a los pacientes, siendo responsable de la organización de las historias clínicas y reposición de material sanitario.

D.4.-Auxiliar administrativo: 1 secretaria, que es la responsable de asignar las citas de revisión o de pruebas complementarias específicas en la Unidad de Alimentos y Medicamentos. También es la responsable de entregar los justificantes de asistencia a los pacientes y sus acompañantes, si los precisaran.

3.1.2.- PACIENTES ALERGICOS a PROTEINAS DE LECHE DE VACA:

3.1.2.1.- Origen de los Pacientes.

Los pacientes del estudio han sido seleccionados a partir de aquellos que acuden de forma rutinaria a la Consulta de Alergología situada en la tercera planta del Hospital del Tórax (Santa Cruz de Tenerife), dentro de la cual se sitúa la Unidad de Alergia alimentaria.

Los pacientes son derivados a esta consulta tanto por parte del médico de cabecera de los centros de Atención Primaria o por otros especialistas hospitalarios del Área norte de Tenerife, siendo los más habituales:

- Pediatría
- Otorrinolaringología
- Neumología
- Dermatología
- Digestivo
- Medicina Interna
- Oncología
- Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), etc.

El médico responsable de un paciente es el que realiza la interconsulta a nuestra unidad si cree que el paciente presenta clínica sugerente de patología alérgica, solicitando confirmación diagnóstica, pauta terapéutica, evaluación pronóstica y/o seguimiento evolutivo. La solicitud inicialmente es valorada por el especialista de la unidad que actúa como consultor, y si considera válida la solicitud ésta es remitida a la servicios administrativos o cita previa, que será la encargada de realizar la citación e informar al paciente.

3.1.2.2.- Selección de Pacientes.-

Dentro del amplio grupo de patologías que abarca la Alergología se encuentra la Alergia Alimentaria, la cual en los últimos años ha ido creciendo en demanda -ver Introducción- lo cual ha hecho necesario que exista dentro de la Consulta de Alergología una unidad específica de Alergia Alimentaria con protocolos específicos para cada procedimiento, donde son centralizados estos pacientes para un manejo óptimo.

En el presente estudio seleccionamos la muestra dentro del grupo de pacientes que habían sido remitidos de forma rutinaria por sospecha de “Alergia Alimentaria a proteínas de leche de vaca” y se confirmó el diagnóstico según protocolo habitual establecido –ver introducción-.

Los pacientes son seleccionados retrospectivamente en la base de datos informatizada que contiene los pacientes alérgicos a alimentos confirmados de la Unidad, donde aparecen sólo los datos clínicos y demográficos que conciernen a su patología, los cuales son registrados con consentimiento según protocolo establecido. Esta base de datos permite analizar la información clínica seleccionando el grupo de pacientes que se pretende agrupar en cada caso, y que en el estudio actual serían específicamente los pacientes alérgicos a proteínas de leche de vaca, y nos permite obtener datos relativos a las características demográficas, como sexo, edad, antecedentes personales y familiares, y clínicas, como edad de inicio, síntomas que manifiesta, métodos de diagnóstico utilizados, etc..

Se considera como posible candidato susceptible de ser incluido en el grupo de pacientes del presente estudio a todos aquellos que cumplan con los siguientes criterios:

A.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

1. Niños >o igual a 3 años
2. Sensibilización alérgica a 1 o varias proteínas de leche de vaca (alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina, caseína) confirmado mediante prick test y determinación de niveles séricos de IgE específica .
3. Reacciones clínicas graves, Anafilaxia (grado II-III de Müller, ver tabla).
4. Presentar al menos 1 criterio de mal pronóstico (ver apartado C),

Grade	Müller	Symptoms
Mild	I	Generalized urticaria, itching, malaise, anxiety
	II	<i>Any of the above, plus two or more of the following:</i> angioedema, constriction in chest, nausea, vomiting, diarrhoea, abdominal pain, dizziness <i>Or:</i> Angioedema alone
Severe	III	<i>Any of the above, plus two or more of the following:</i> dyspnoea, wheezing, stridor, dysphagia, dysarthria, hoarseness, weakness, confusion, feeling of impending disaster <i>Or:</i> Dyspnoea, wheezing or stridor alone
	IV	<i>Any of the above, plus two or more of the following:</i> fall in blood pressure, collapse, loss of consciousness, incontinence, cyanosis

Tabla: Clasificación de severidad de Anafilaxia (Adaptado de Müller)

B.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

1. Imposibilidad de realizar alguna de las pruebas complementarias que valoran la sensibilización alérgica, como prick test o IgE específica, que impiden el seguimiento evolutivo.
2. Dificultades para seguir el régimen de sesiones periódicas necesarias para realizar el procedimiento.
3. Pacientes diagnosticados sólo por métodos diagnósticos según protocolo, y que no han presentado clínica clara que confirme la alergia alimentaria.

C.-FACTORES DE MAL PRONÓSTICO:

Se ha seleccionado a aquellos pacientes que presentan factores considerados de mal pronóstico -Ver Introducción-, como son:

- la presencia de reacciones clínicas graves o anafilaxia grado II-III.
- la persistencia de sensibilización inmunológica a proteínas de leche de vaca a partir de los 3-4 años, especialmente si va dirigida hacia la caseína
- reacciones graves incluso por contacto con cantidades muy pequeñas o trazas, de difícil evitación y que favorecen el riesgo de reacciones por contactos inadvertidos o por contaminación cruzada.

Todos los pacientes seleccionados manifestaban reacciones graves tras contacto accidental con leche, con anafilaxia grado II-III, por lo que precisaban llevar medicación de rescate de forma permanente, que sería adrenalina autoinyectable. A pesar de seguir una dieta restrictiva sin leche ni derivados de forma estricta, todos tenían antecedentes documentados de haber precisado asistencia urgente en centro sanitario por estos contactos inadvertidos en al menos 1 ocasión en el último año de seguimiento.

3.1.3.- ALIMENTO: Leche de vaca

Para realizar las pruebas de provocación y desensibilización alimentaria se utiliza el propio alimento, en este caso la leche. Considerando la amplia variedad de leches según origen animal –de vaca, cabra, oveja, etc-, procesos de esterilización utilizados – como la leche fresca o no procesada, la uperizada y UHT- y procesamientos que alteran su composición – como entera, semidesnatada, desnatada- lo cual hace variar su características -Ver Introducción-. Se decidió utilizar en todos los casos el mismo tipo de leche para asegurar que la concentración y características del producto fueran homogéneas.

Decidimos utilizarla leche que suministraba el hospital a los pacientes ingresados para asegurar su disponibilidad. Debido a que se trataba de población infantil, se eligió la *leche entera* al ser ésta la recomendada generalmente en este grupo de edad. La leche que ofrece el hospital es leche entera de vaca tipo UHT .

3.2.- MÉTODOS

3.2.1.- PRUEBAS CUTANEAS

La prueba cutánea con alimento es considerada la prueba de elección para iniciar el estudio del paciente con sospecha de alergia alimentaria.^{3,7,35} Detecta la presencia en piel de anticuerpos tipo IgE frente a un alimento concreto, así como la actividad mastocitaria local que ocasiona en caso de interaccionar con el alimento de forma específica cuando se desencadena la respuesta alérgica de hipersensibilidad inmediata o tipo I.³³

3.2.1.1.- Prick Test

La prueba cutánea más utilizada es la intraepidérmica o prick test, y consiste en la introducción del extracto de alimento en la epidermis utilizando una lanceta que ocasione una punción superficial que no dañe la dermis.³⁵

A.- EXTRACTO de ALIMENTO

Para la realización del prick se utilizan extractos del alimento que se obtienen a partir de la fuente natural, a través de la extracción en laboratorio de la fracción proteica que es la que posee las propiedades alergénicas. Como resultado de esta extracción se separa el contenido proteico del resto de componentes no relevantes y mejora la especificidad del producto.

Estos extractos son glicerizados con una dilución 1/10 por peso/volumen, y deben estar cuantificados en contenido proteico en mg/ml, así como testados previamente en ensayos previos de acuerdo a la normativa reguladora existente para conocer su potencia biológica.¹⁰⁹

B.- TECNICA:

La técnica para realizar adecuadamente el prick test está estandarizada y aceptada a nivel internacional desde hace años, y su uso está ampliamente extendido en las consultas de Alergia como técnica rutinaria.³³

Para su realización se precisa no sólo del extracto de alimento sino de un control positivo, la histamina, y un control negativo con suero salino fisiológico, que valore la reactividad cutánea del paciente. Se aplica una gota

en la cara interna del antebrazo y se punciona con una lanceta, en nuestro caso una lanceta metálica (ALK-Lancet®, ALK-Abelló, Dinamarca), de forma que sólo se erosiona la epidermis, poniendo en contacto el extracto con los linfocitos intraepiteliales que sólo podrán reconocerlos y desencadenar la respuesta alérgica local si el paciente está previamente sensibilizado.¹¹⁰

C.- LECTURA e INTERPRETACION

Para una adecuada lectura e interpretación de resultados hay que tener en cuenta las condiciones en que se realiza. Diversos factores como la edad del paciente, coexistencia de enfermedades cutáneas o sistémicas, o el uso de tratamientos tópicos o sistémicos en ese momento, han sido descritos como modificadores de la respuesta cutánea.¹¹⁰⁻¹¹²

La lectura debe realizarse transcurridos 15 minutos y su interpretación se rige por las siguientes normas:³³

- para que se considere *válida* la respuesta al prick, el control positivo debe tener al menos 3mm de diámetro.
- para ser considerada *positiva* (+) debe tener al menos de 3mm de diámetro, y ser mayor que el control negativo.
- Si el control positivo es menor de 3mm debe considerarse la lectura como *no valorable por* la técnica, ya sea por falta de reactividad cutánea propia del paciente o anergia, o por otra patología subyacente, o secundaria a medicación concomitante -ver listado de fármacos en apartado D-.
- En caso de que el control negativo resultara positivo, debe considerarse que el paciente presenta *dermografismo* o respuesta anómala ante factores físicos o hiperreactividad cutánea inespecífica, y por tanto el resultado del prick quedaría invalidado.

El resultado de la lectura de las pruebas cutáneas se puede expresar de la siguientes formas:³³

- milímetros del diámetro mayor de la pápula
- media entre el diámetro menor y mayor
- o por cruces (+) según plantillas normalizadas: 1,2,3 ó 4 cruces.

Esta última parece la más sencilla pero está sujeta a más variabilidad según el personal que lo utilice. La técnica de lectura más utilizada es la que mide el diámetro de pápula en milímetros.

D.- INDICACIONES previas de FARMACOS a EVITAR:

Se indica a continuación la medicación a tener en cuenta para su previa suspensión así como el periodo mínimo necesario:¹⁸²

- Antihistamínicos:
 - la mayoría suelen precisar 7 días
 - algunos más antiguos precisan periodos más largos, como hidroxizina 15 días, Astemizol 90 días, y ketotifeno hasta 30 días.
- Corticoides:
 - Por vía inhalada se mantienen las dosis efectivas de tratamiento sin cambios en las últimas 2 semanas
 - Por vía oral evitar 2 semanas.
- Betabloqueantes: 7 días
- Depresores del SNC (comor reserpina, clonidina): 21 días
- Antidepresivos tricíclicos: 14 días

Para minimizar la variabilidad de la técnica, el personal encargado es siempre enfermería entrenada que diariamente lo realiza de forma rutinaria. Se

utilizan siempre los mismos extractos comerciales para los alimentos estudiados (BIAL®, Bilbao, España) , que en el caso de la leche serían:

- leche de vaca: 5mg/ml
- leche de cabra: 10mg/ml
- alfa-lactoalbúmina: 5mg/ml
- beta-lactoglobulina: 1mg/ml
- caseína: 10mg/ml

Los extractos deben ser conservados en refrigeración, entre -4 y -6°C. En caso de que los extractos en algún momento permanecieran fuera de la nevera más 24 horas o si por error se someten a congelación, deberán ser desechados y reemplazados por unos nuevos, al considerarse que las propiedades de sus proteínas pueden quedar alteradas y por tanto artefactar el resultado de las pruebas cutáneas.

3.2.1.2.- Prick-Prick test.

En algunos casos se puede utilizar esta otra técnica en la cual la única diferencia es que se utiliza el alimento directamente aplicado sobre la piel en lugar de extracto alergénico. Aporta como ventaja que al tratarse de alimento fresco existe mayor riqueza de contenido en alérgenos potenciales al no haber sido sometido a procesamiento de laboratorio, filtración, cambios de temperatura, etc, que pueden alterar la cantidad y potencia biológica del producto por procesos que desnaturalizan la estructura de sus componentes.

Como desventaja hay que tener en cuenta que el alimento puede contener agentes con efecto irritativo que podrían ocasionar de forma errónea una respuesta cutánea aparentemente positiva o falso positivo, pero que no está ocasionada por mecanismos mediados por la inmunoglobulina E, sino por estimulación directa mastocitaria -degranulación inespecífica mastocitaria- lo cual ha de ser considerado por el personal que realiza la lectura a la hora de una adecuada interpretación de los resultados obtenidos.

3.2.2.- DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINA ESPECÍFICA SÉRICA

Existen diversas técnicas validadas para la determinación de IgE e IgG específica sérica, mediante radioisótopos, inmunoensayos, colorimétricas, etc, que presentan valores similares de correlación. Actualmente la técnica más extendida y la que utilizamos en nuestro centro sanitario es InmunoCAP (Pharmacia®, Suecia) que mediante una curva dosis-respuesta permite cuantificar los niveles en sangre de IgE y IgG específica.¹¹³

A.- El *InmunoCAP Specific IgE*: detecta los niveles de inmunoglobulinas tipo IgE en un intervalo de 0 a 100 kU/l, y el resultado se notifica de forma cuantitativa. Normalmente, en la práctica clínica el valor 0,35 kU/l se ha utilizado como cut-off, aunque en algunos casos se considera que es 0,1 kU/l. Se han realizado numerosos estudios en los que se ha evaluado el rendimiento clínico de las pruebas *ImmunoCAP Specific IgE* para el diagnóstico de alergias.

El rendimiento clínico se expresa como sensibilidad, que oscila entre el 84 y el 95%, y especificidad, que oscila entre el 85 y el 94%. También ha demostrado tener una buena reproducibilidad y aporta resultados fiables en un amplio rango de valores de IgE, aunque los valores predictivos del resultado positivo o negativo son variables según el alimento evaluado.¹¹⁴

Esta técnica ofrece más de 650 alérgenos distintos y 90 componentes alérgicos para la detección cuantitativa precisa y sensible de anticuerpos IgE de alérgenos determinados. En el caso de la leche, nos permite medir actualmente los niveles de IgE específica frente a los siguientes componentes:

- leche de vaca (f2),
- leche de cabra (f300),
- leche de oveja (f325)
- y sus proteínas séricas más relevantes: alfa-lactoalbúmina (nBos d 4, f76), Beta-lactoglobulina (nBos d 5, f77) , Caseína (nBos d 8, f78).

B.- EL *InmunoCAP Specific IgG*: mide los anticuerpos IgG específicos de un antígeno presentes en el plasma y suero humano. Estos anticuerpos son parte del sistema de defensa natural del cuerpo y se desarrollan como resultado del contacto con sustancias extrañas. La presencia de anticuerpos IgG específicos de un antígeno en particular es un marcador de la exposición a dicho antígeno. Se pueden analizar los mismos alérgenos que se estudian en el InmunoCAP Specific IgE.

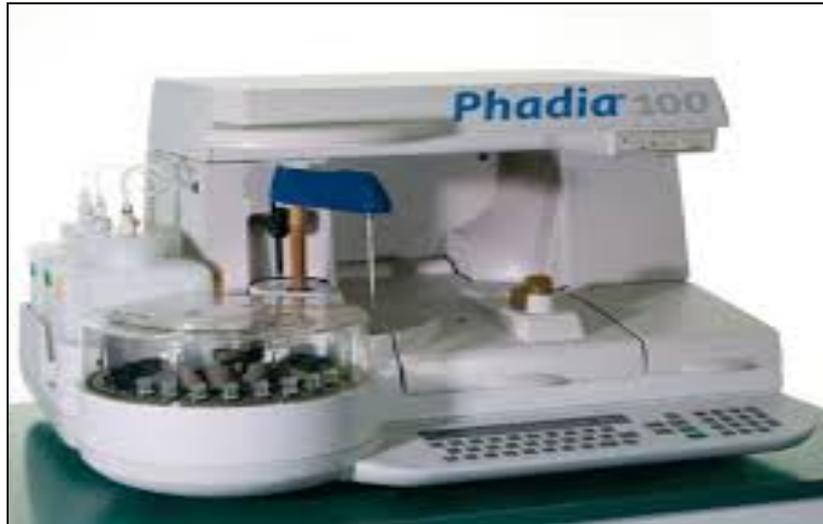


Imagen: InmunoCAP de Phadia

3.2.3.- CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS

Para cuantificar las citoquinas se utilizó un Kit de la casa comercial Affymetrix® (EE.UU.) denominado Procarta® Cytokine Assay que permitió analizar mediante un citómetro por fluorescencia (Luminex®) un grupo amplio de citoquinas en un mismo ensayo:

- beta NGF, Eotaxina, FGF Basic, G-CSF, GM-CSF, GRO-alpha
- IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-10, IL-12 p40, IL-12 p70, IL-13, IL-17,
- IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8,
- INF-gamma, IP-10, MCP-1, MCP-3, MIP1-alpha, MIP1-beta, PDGF
BB, RANTES, TNF-alpha, TGF-beta, VEGF-A.

Este tipo de Kit permite la cuantificación de múltiples citoquinas en un único ensayo a la vez con un volumen de muestra escaso, unos 25 μL , y con un límite de detección de 1 pg/mL .



Imagen: Kit Procarta® Cytokine Assay y aparato de Luminex®

3.2.3.1.- MATERIALES: Los materiales y reactivos incluidos en el kit que fueron utilizados son:

- Tampones: de lectura, de lavado 10X, de ensayo
- Tampón de estándar de sueros y tampón de estándar de lavados
- Anticuerpo de detección
- Liofilizado de antígenos estándar
- Estreptavidina-PE
- Esferas recubiertas de anticuerpos
- Placa de 96 pocillos
- Selladores de placa
- Tira de 8 tubos de PCR para los estándares

3.2.3.2.- PREPARACIÓN de muestras y estándares

Las muestras de suero fueron diluidas previamente 1:4 en tampón PBS 1X. Para los estándares, un liofilizado de antígenos estándar fue reconstituido con 250 μL de tampón estándar de suero, quedando a una concentración de 40×10^3 pg/mL . Se realizaron diluciones seriadas 1/4 en tira de 8 tubos de determinación de PCR para obtener una curva de 8 puntos, con un último estándar a una concentración de 2,44 pg/mL .

3.2.3.3.- PROCEDIMIENTO de Laboratorio

- Al inicio del ensayo se incubó la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente con 150 µL de tampón de lectura, eliminado después mediante filtración utilizando un dispositivo adherido a una bomba de vacío.
- Seguidamente se añadieron 50 µL de esferas con anticuerpos a cada pocillo y se lavaron por filtración. Se lavó la placa con 150 µL de tampón de lavado y se eliminó por filtración.
- El siguiente paso fue añadir 25 µL de tampón de ensayo a los pocillos estándar y a los pocillos de muestras de suero quedando los pocillos de muestras de lavado vacíos. Finalmente se añaden 25 µL de los 8 estándares preparados, de suero y de lavados, y de las muestras de suero en los pocillos correspondientes y 50 µL de las muestras de lavado en los pocillos adecuados. De esta manera los estándares y los sueros sufrirían una dilución $\frac{1}{2}$ extra.
- Una vez distribuidas las muestras y los estándares se sella la placa y se incuba a temperatura ambiente y en agitación (500 rpm) 1 hora.
- Tras los 60 minutos, se eliminó por filtración el contenido de los pocillos y se lavó la placa 3 veces con 150 µL de tampón de lavado.
- Se añadieron 25 µL de anticuerpo de detección, se selló la placa y se incubó a temperatura ambiente media hora a 500 rpm.
- Se eliminó la solución por vacío y se lavó la placa 3 veces con 150 µL de tampón de lavado.
- Se añadieron 50 µL de estreptavidina-PE y se incubó la placa durante media hora.
- Se eliminó el contenido de la placa por filtración y se añadieron 120 µL de tampón de lectura, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se procedió a la lectura de la placa de 96 pocillos en el citómetro de fluorescencia (Luminex®).

3.2.4.- TEST de PROVOCACIÓN ORAL

La prueba de provocación o exposición oral con el alimento en estudio de forma controlada y supervisada por personal sanitario especializado, se considera el procedimiento definitivo para descartar o confirmar un diagnóstico de alergia alimentaria.¹¹⁵

3.2.4.1.- Método e indicaciones

La metodología a utilizar puede variar en los diferentes estudios publicados debido a la gran diversidad de alimentos que pueden ser utilizados , con características muy variables, así como el tipo de paciente y clínica manifestada, aunque existen recomendaciones para su adecuada aplicación elaboradas por comités científicos formados por expertos.^{3,35,115}

A.- INDICACIONES de la PROVOCACIÓN ORAL a Alimento:

- Si existe sensibilización inmunológica a un alimento pero se desconoce la tolerancia o no al no haber existido contacto posteriormente.
- Si se sospecha que un síntoma crónico puede estar relacionado con un alimento pero no se ha podido establecer relación causa-efecto.
- Para valorar la evolución en un paciente con alergia alimentaria confirmada en el que se sospeche mejoría de la sensibilización.
- En estudios clínicos con fines de investigación científica si el paciente da su consentimiento informado.

Se considera que NO es preciso realizar la provocación oral para confirmar el diagnóstico alimentaria:

- En los casos de reacción grave o anafilaxia -Ver Clínica en Introducción- en los que se ha establecido una relación causa-efecto clara.
- En pacientes con una relación causa-efecto clara, sobretodo si es repetida en más de una ocasión, y el hallazgo de un estudio alergológico positivo (puebas cutáneas o niveles séricos de IgE específica).

B.- CONTRAINDICACIONES de PROVOCACIÓN ORAL:

- Si está contraindicado el uso de Adrenalina en el paciente, o si utiliza fármacos que bloquean el efecto de ésta, como beta-bloqueantes, antidepresivos tricíclicos, antihipertensivos tipo IECA, inmunosupresores, etc.
- En mujeres embarazadas
- En pacientes con asma inestable y/o FEV1 <70% del teórico.
- En pacientes con mastocitosis.
- En pacientes con dermatitis atópica grave u otra enfermedad cutánea que dificulte la valoración de la respuesta.

C.- PROCEDIMIENTO

El protocolo utilizado para realizar la provocación oral debe estar diseñado para ajustarse a las condiciones de espacio y personal de cada servicio. En nuestra consulta los protocolos utilizados ha recibido previamente la aprobación del comité de calidad asistencial.

Se administran por vía oral una serie de dosis crecientes del alimento, leche en este caso, con intervalos de tiempo fijo según protocolo establecido - ver Anexo- ajustando la dosis final según la edad del paciente, para alcanzar lo que se considera la dosis habitual ingerida. Se comienza a las 9:00 de la mañana administrando dosis consecutivas del alimento a intervalos regulares de 30 minutos. El periodo mínimo de observación desde que se administra la última dosis cada día es de 2 horas.

- Se considera resultado POSITIVO: En el caso de que se objetiven signos o síntomas durante la provocación por el personal sanitario responsable que se consideren concluyentes de reacción adversa alimentaria de forma definitiva. Se administra el tratamiento adecuado según criterio médico, y se prolonga la observación hasta un periodo mínimo de 1 hora tras la resolución del cuadro. Cualquier manifestación clínica manifestada por el paciente o cualquier incidente sucedido durante ese periodo debe ser registrado en la historia del paciente y valorado por el médico responsable.

- Se considera resultado NEGATIVO: si una vez terminada la provocación y alcanzada la dosis estipulada, transcurre el tiempo de observación establecido y el paciente no manifiesta ningún tipo de manifestación clínica. En caso de que en la anamnesis se hubiera detectado la existencia de un periodo de latencia superior al habitual (de 1 a 2 horas como máximo), se puede establecer un periodo de observación mayor acorde a la clínica referida.

El personal sanitario de la Unidad de Alimentos es el responsable de monitorizar las posibles reacciones adversas secundarias a la administración del alimento. Ante la sospecha de una reacción adversa sugerente de alergia alimentaria se utilizarán las pautas de actuación protocolizadas de tratamiento urgente instauradas previamente en el Servicio de Alergia de nuestro hospital, específicos según el tipo de síntoma y la severidad de los mismos.

Todas las provocaciones se realizaron bajo estricta supervisión médica con disponibilidad permanente de un equipo completo de *RCP básica* -Ver MATERIAL- así como contacto telefónico mediante teléfono directo con la unidad de Cuidados intensivos o con el médico Intensivista de guardia localizado a través de centralita, y accesibilidad directa con la Unidad de Intensivos por si se precisara trasladar al paciente de forma inmediata para la RCP avanzada. Para ello la unidad de intensivos está informada previamente de los días en los que se va a realizar los procedimientos de mayor riesgo.

En los casos de *pacientes de alto riesgo* se recomienda ingresar al paciente en camas de unidad de cuidados intensivos desde el inicio del procedimiento, concertando el día en que se realizará previamente con el supervisor de camas de la UVI y contando con la aprobación del jefe de la unidad. Se concierta asumiendo que sólo se podrá realizar si la demanda asistencial y la necesidad de camas para ingreso en ese momento lo posibilita, lo cual es informado previamente al paciente y tutores. Si la mañana en la que estaba programada la desensibilización finalmente no hay camas disponibles,

el supervisor de la unidad de intensivos debe comunicarlo a primera hora de la mañana al responsable del procedimiento para que avise al paciente, siendo citado en el siguiente hueco disponible en la agenda.

3.2.4.2.- Tipos de Provocaciones

Se han desarrollado diversas variantes del procedimiento de la prueba de provocación oral en función de las características clínicas del paciente y de la reacción adversa a valorar:^{35,115}

A.- Provocación oral abierta: en este procedimiento tanto el paciente como el médico conocen y ven el alimento que reciben. Es el método más sencillo pero puede implicar problemas de interpretación por aspectos emocionales que ocasionen en el paciente aversión o miedo por reacciones previas importantes.

B.- Provocación oral simple ciego: en este caso se entrega al paciente un alimento enmascarado para que no detecte si se trata del alimento que se quiere estudiar o es un placebo, otro producto que el paciente tolere. Sólo el médico conoce el contenido de cada ingesta o dosis. Mejora la interpretación pero aún queda la posible subjetividad por parte del médico que realiza la valoración al conocer el contenido de cada dosis.

C.- Provocación oral doble ciego: En este caso ni el paciente ni el médico conocen el contenido de cada dosis que se le ofrece durante el procedimiento. Implica la necesidad de un tercer participante que sería el que elabora la distribución de placebo y del verum o alimento, pero que no debe tener contacto con el médico que valora el procedimiento ni con el paciente. Sólo al final tras la valoración definitiva del proceso, se puede desvelar la distribución de contenidos y compararlo con los síntomas registrados durante el procedimiento. Esta última está considerada la prueba “gold standard” en el diagnóstico de alergia alimentaria.¹¹⁵

3.2.5.- PROTOCOLO de DESENSIBILIZACIÓN ALÉRGICA ALIMENTARIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA

3.2.5.1.- Selección de pacientes candidatos a desensibilización a leche

Una vez identificados en consulta aquellos pacientes que presentaban factores de mal pronóstico -Ver MATERIAL- se les informa a sus padres o tutores de la previsible mala evolución de la alergia alimentaria a leche de su hijo, y que parece probable que va a evolucionar hacia la forma clínica de alergia persistente, y por ello se les ofrecen dos opciones de seguimiento:

1.- mantener el seguimiento evolutivo como hasta ese momento, con observación clínica cada 6 meses y valorar los posibles cambios que de forma espontánea pueda presentar el paciente o no, siguiendo la dieta restrictiva estricta sin leche ni derivados lácteos,

o alternativamente,

2.- iniciar el procedimiento de desensibilización alimentaria con leche de vaca, según el protocolo establecido previamente en la Unidad, con la intención de modificar la respuesta inmunológica del paciente, con el seguimiento clínico posterior igualmente establecido en la unidad.

En caso de que se muestren favorables a aceptar la inclusión en el protocolo de desensibilización alimentaria, se les hace entrega de la información por escrito así como el consentimiento informado aprobado por Comité ético hospitalario para su posterior lectura en domicilio y firma.

En caso de firmarlo lo entregan en la siguiente consulta programada y se inicia el procedimiento según protocolo -Ver ANEXO 1 con consentimientos y hoja informativa de pacientes-.

3.2.5.2.- REQUISITOS para el Procedimiento:

1.- El paciente menor deberá estar acompañado por alguno de sus padres o tutores en todo momento.

2.- El paciente y su acompañante deberán ser informados del procedimiento a realizar, los riesgos y beneficios que conlleva, y si consienten a su realización se deberá firmar el consentimiento informado específico para este procedimiento aprobado por el comité ético –ver Anexo 3-.

3.- Para su realización se precisará de una sala dotada de aparataje de monitorización cardiorrespiratoria y de reanimación cardiopulmonar o RCP, así como de la presencia física de al menos un médico y una enfermera que serán los responsables de llevar a cabo dicho procedimiento.

4.- Además deberá ser informado el servicio de cuidados intensivos o UCI de la realización de este procedimiento en ese día por si se precisara trasladar al paciente. Si las condiciones lo precisaran, en pacientes de mayor riesgo, se podría valorar la realización de este procedimiento dentro de la propia unidad de cuidados intensivos.

5.- El día que comience el proceso de desensibilización se comprobará el estado del paciente en los últimos días, como procesos infecciosos recientes, estabilidad de otras enfermedades concomitantes, etc, y la ausencia de reacciones adversas alimentarias en la última semana, así como revisión del tratamiento que esté realizando en ese momento.

6.- Se debe informar a los padres del plan programado de sesiones para que puedan acudir siempre a acompañar al paciente, debiendo tener previsto y avisado la ausencia durante toda la mañana tanto del niño en su colegio o guardería como de los padres en su actividad laboral.

3.2.5.3.- PROTOCOLO de desensibilización

La desensibilización oral con alimentos consiste en la administración de dosis creciente del alimento por vía oral bajo supervisión médica cada 30 minutos monitorizando en todo momento la respuesta clínica del paciente.

En el protocolo utilizado en este estudio se comienza utilizando leche diluida con agua en varias proporciones: 1/100, 1/10, y 1/1 o sin diluir, y se administran siguiendo las dosis marcadas en el protocolo establecido -Ver ANEXO 2-.

Este protocolo se divide en 2 fases:

A) 1ª FASE : Desensibilización rápida hospitalaria (2 días)

El paciente permanece ingresado en la unidad de cuidados intensivos pediátricos o UCIP del hospital durante media jornada de 8:00 de la mañana a 15:00 de la tarde durante 2 días consecutivos para poder cumplir con el régimen de dosificación pautado.

1º) durante el 1º día se utilizará leche diluida 1/100 y se administrarán dosis cada 30 minutos: 1ml → 2ml → 4ml → 8ml → 16ml → 32ml, con un periodo final de observación de 2 horas.

2º) El 2º día se continuará con leche diluida 1/10 con dosis cada 30 minutos al ritmo siguiente: 3,2ml → 6ml → 12ml. Si evoluciona favorablemente ese mismo día se podría introducir leche sin diluir: 2 ml y a los 30 minutos, y 4ml en algunos casos según edad del paciente, con una observación final de 2 horas.

3º) Si se obtiene buena tolerancia a la dosis de 4 ml, el paciente debe continuar tomando esta misma dosis cada 12 horas en su domicilio durante 1 semana.

4º) A partir de ese momento el paciente acudirá 1 vez cada 7 días para proceder a incrementar la dosis semanalmente al ritmo estipulado en el protocolo manteniendo la ingesta cada 12 horas en su domicilio el resto de la semana para asegurar la permanencia de esta tolerancia.

B) 2ª FASE: Desensibilización ambulatoria en consulta

El paciente debe acudir semanalmente a la unidad de Alimentos para proceder al incremento de dosis que le corresponde, y en caso de comprobar su respuesta favorable, mantenerla en domicilio repitiendo la toma 2 veces al día con la cantidad indicada.

En cada revisión según la tolerancia descrita por el paciente en su domicilio, se decide si se continúa doblando la dosis según marca el protocolo o se mantiene igual. Por este motivo la duración total de esta fase, inicialmente marcada como de 7-9 semanas, puede verse alargada si el paciente lo precisa.

3.2.5.4.- SEGUIMIENTO EVOLUTIVO de pacientes durante la Desensibilización alimentaria a leche de vaca

Una vez que el paciente alcanza la dosis máxima esperada de 200 ml de leche se mantiene la misma cantidad en régimen de 2 veces al día de forma mantenida y se pasa a la Fase de Mantenimiento de la Desensibilización alimentaria, con seguimiento clínico evolutivo en la consulta. Durante esta fase el paciente acude regularmente a consulta según protocolo establecido, cada 6 meses generalmente o antes si lo precisa -Ver protocolo en Anexo 2-.

Se le hace entrega de una hoja con recomendaciones dietéticas para la introducción progresiva de lácteos en la dieta cotidiana, así como pautas y tratamiento a realizar si presentara alguna sintomatología sugerente de reacción adversa alimentaria -Ver Anexo 1 con hoja de información-.

- El paciente deberá asegurarse de mantener de forma constante una ingesta diaria aproximadamente cada 12 horas en su domicilio de la dosis máxima de leche tolerada. No repetir la dosis antes de las 6 horas.
- En caso de que la dosis no fuera administrada durante un periodo igual o superior a las 48 horas se deberá consultar antes de la administración de la siguiente dosis en domicilio
- Si por algún motivo se produjera la interrupción de administración de dosis de leche durante el periodo inicial de desensibilización, el paciente deberá acudir a consulta para valoración de cual sería la dosis adecuada para reiniciar el proceso de desensibilización.
- Tendrá que valorarse el periodo que ha estado el paciente sin recibir su dosis diaria de leche y cuál fue la última cantidad tolerada. En caso de periodos más de 2 días o si la última dosis aún era muy baja, a criterio del médico se puede considerar la posibilidad de reintroducir la misma dosis en la unidad de Alimentos, disminuir la dosis a la anterior tolerada, o reiniciar el proceso.

Además se le hace entrega de un informe detallado y personalizado con el tratamiento que tiene que tener disponible en su domicilio para este tratamiento:

- Adrenalina 1:1000 intramuscular en autoinyector precargado (Altellus® infantil 150microgr, o Altellus® 300microgr).
- Dexclorfeniramina maleato (Polaramine®) 2mg/5ml, en solución
- Deflazacort (Zamene®) en gotas , a razón de 1 gota por kg/día.

Durante este periodo el paciente tiene acceso telefónico con la consulta y con el médico responsable durante las 24 horas del día por si precisara alguna aclaración, o si presentara alguna reacción adversa y quisiera consultar la actitud a tomar.

En cada revisión clínica semestral se recogen los datos clínicos y se valora la tolerancia a la dosis marcada, así como a los diferentes productos derivados que ha ido introduciendo según pauta dada , como yogur, queso, nata, etc. También se valoran las posibles manifestaciones adversas registradas en la ficha por el paciente, el tratamiento realizado y las circunstancias en las que se produjeron.

Se procede también a realizar las pruebas complementarias establecidas -Ver Protocolo en Anexo 2- para valorar la evolución de la sensibilización inmunológica:

- pruebas cutáneas: leche de vaca y cabra, alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina, caseína.
- niveles séricos de Inmunoglobulinas específicas tipo IgE e IgG frente a leche de vaca y cabra, así como a las proteínas lácteas alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina y caseína.

Los resultados son registrados en la historia del paciente para poder realizar la comparativa con resultados anteriores y valorar evolución inmunológica de su sensibilización alérgica a leche. Al final de cada revisión se le hace entrega de un nuevo informe detallando la dosis de leche que debe seguir tomando en casa, las modificaciones en la dieta que puede llevar a caso, como introducción de nuevos derivados lácteos como yogurt, mantequilla, nata, queso fresco o curado, etc, así como el tratamiento actualizado que debe tener disponible para el tratamiento de eventuales reacciones adversas.

4.- RESULTADOS:

4.1.- PRIMERA FASE DEL ESTUDIO:

La desensibilización alimentaria es un método válido como procedimiento terapéutico en pacientes con alergia grave a proteínas de leche de vaca.

En el año 2007 se hizo la primera revisión en la base de datos buscando pacientes que estuvieran en seguimiento por alergia a proteínas de leche de vaca en la consulta de Alergología y cumplieran los criterios de inclusión referidos, que han sido referidos en Métodos, descartándose aquellos que presentaran alguno de los criterios de exclusión .

Se seleccionaron entre todos los pacientes preseleccionados aquellos que cumplieran los criterios de mal pronóstico ya indicados en Métodos y se les propuso realizar el procedimiento de desensibilización, haciéndoles entrega de la hoja informativa de pacientes -ver Anexo 1-.

Todos mostraron su conformidad, y sus progenitores y/o tutores firmaron el consentimiento informado. Inicialmente sólo pudo realizarse el procedimiento en 10 pacientes durante el primer año, que son los que fueron incluidos en la primera fase. Aunque posteriormente se pudo continuar incluyendo en los siguientes 2 años hasta 30 pacientes.

4.1.1- Muestra : se seleccionaron 10 pacientes que cumplían los criterios

- 9 pacientes niños/ 1 paciente niña.
- rango de edad: de 2 a 15 años
- mediana: 6 años

4.1.2- Manifestaciones clínicas:

- En todos los casos o 100%, los pacientes referían presentar síntomas y signos compatibles con clínica sistémica inmediata o *Anafilaxia* como

manifestación adversa tanto por ingesta inadvertida como por contacto cutáneomucoso.

- Todos los pacientes habían presentado algún acontecimiento adverso en los últimos doce meses por contacto *inadvertido*
 - 2/10 urticaria localizada o angioedema mucoso palpebral o labial por contacto externo cutáneo.
 - 1/10 broncoespasmo por inhalación de vapores de cocción
 - 3/10 urticaria leve y 2/10 urticaria moderada por ingesta inadvertida de repostería con trazas de leche.
 - 2/10 anafilaxia grado I de Müller por ingesta de alimentos contaminados por transmisión indirecta en utensilios de cocina, en los 2 casos durante comidas fuera de domicilio habitual.

- El diagnóstico de alergia a proteínas de leche se realizó en todos los pacientes según protocolo detallado en Métodos mediante:
 - la anamnesis compatible y sugerente con reacciones adversas graves reiteradas en contacto con leche.
 - detección positiva de IgE específica sérica a leche mayor de 0,35 kU/l .
 - resultado positivo a leche/proteínas de leche en el prick con pápula de diámetro mayor o igual a 3 mm .

- Todos los pacientes tomaban como alternativa dietética un preparado alimenticio en forma líquida denominada “leche de soja” en el momento de ser reclutados, aunque 8/10 inicialmente habían utilizado fórmulas de hidrolizado de proteínas de leche hasta los 2 años.

4.1.3.- **Antecedentes personales:**

- Todos los pacientes estaban diagnosticados además de alergia respiratoria mediante anamnesis compatible y pruebas cutáneas e IgE específica positivas:
 - En el 100% la sensibilización respiratoria era a Acaros
 - 10/10 *Dermatophagoides spp*

- 2/10 *Blomia tropicalis*
- Rinitis: todos los pacientes tenían rinitis (100%) y según la clasificación ARIA¹¹⁷ se pueden distinguir 2 grupos
 - 8/10 rinitis leve persistente
 - 2/10 moderada persistente
- Asma: 5/10 eran asmáticos (50%) y según la clasificación GINA¹¹⁶ podemos distinguir estos 3 grupos
 - 2/5 episódico leve
 - 2/5 leve persistente
 - 1/5 moderado persistente
- Otras enfermedades alérgicas:
 - En 3/10 pacientes tenían dermatitis atópica leve.
 - Ninguno presentaba antecedentes de alergia a medicamentos.
 - La mitad o 50% tenían otras alergias alimentarias y 2 de ellos estaban polisensibilizados, con 3 o más alimentos.
 - 4/10 huevo
 - 1/10 pescado
 - 2/10 frutos secos
 - 2/10 leguminosas

	N (%)
Rinitis alérgica	10 (100%)
Asma alérgica	5 (50%)
Dermatitis Atópica	3 (30%)
Otros Alimentos	5 (50%)

Tabla: Antecedentes Personales de la muestra

4.1.4.- Resultados iniciales del Proceso de Desensibilización:

- Primera fase : inicio rápido de 2 días
 - Día 1: todos o 100% los pacientes completaron la pauta programada y alcanzaron tolerancia a 3 ml de leche de vaca diluida al 1/10 en el primer día en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos del HUNSC.
 - Día 2: Nueve de los 10 pacientes o 90% alcanzaron tolerancia a 4 ml de leche de vaca sin diluir en el segundo día en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos del HUNSC.
 - sólo 1 de los 10 pacientes alcanzó sólo la tolerancia de 2 ml de leche de vaca sin diluir en el segundo día en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos del HUNSC.

- Segunda fase : ambulatoria hospitalaria
 - Dosis: todos los pacientes completaron el procedimiento alcanzando la dosis máxima de al menos 200ml de leche de vaca sin diluir.
 - El tiempo necesario para completar el procedimiento fue en su mayoría 6 semanas como estaba programado, y sólo en 2 casos fueron precisas 7 semanas para alcanzar la dosis máxima final de 200ml de leche.
 - Tasa de abandono: 0%

4.1.5- Reacciones adversas:

- Primera fase o rápida, en UCI: Los síntomas presentados por los pacientes y recogidos en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos del HUNSC fueron:
 - sobretodo locales como prurito orofaríngeo:
 - 4/10 el primer día
 - 9/10 el segundo día.

- 3/10 casos de urticaria leve
 - 1/10 caso de urticaria-broncoespasmo.
-
- Segunda fase o ambulatoria: en el domicilio se produjeron reacciones adversas objetivables en todos los pacientes (100%), y recogidos por parte de los progenitores. Estos fueron por lo general leves en las 6-7 semanas de esta fase. En todo momento, estos síntomas fueron informados de modo inmediato y evaluados por parte de la doctoranda.

 - Dentro de las reacciones adversas registradas durante el seguimiento de los pacientes realizado en esta fase, tenemos los siguientes tipos:
 - 1 paciente sólo disconfort abdominal
 - 4 pacientes: prurito en mucosa orofaringe al principio de cada semana con la nueva dosis, hasta la tercera semana
 - 1 paciente: prurito cutáneo difuso y eritema facial en 3 ocasiones durante las primeras 2 semanas.
 - 3 pacientes: urticaria difusa leve las primeras 2 semanas durante el principio de cada semana , por la nueva dosis.
 - 1 paciente rinitis y eritema facial en 2 ocasiones al principio de cada semana

 - Cofactores asociados:
 - En los 3 casos de reacciones cutáneas con prurito y urticaria generalizada, se detectó la coexistencia de fiebre o febrícula por proceso de infección de vías respiratorias altas o cuadro catarral intercurrente.
 - En el resto de las reacciones adversas no pudo identificarse algún cofactor asociado o intercurrente conocido que pudiera influir en la aparición de las reacciones adversas, salvo el incremento de la dosis de leche.

4.2.- SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO:

Evaluación de los diferentes patrones de respuesta inmunológica durante el procedimiento de desensibilización alimentaria con leche

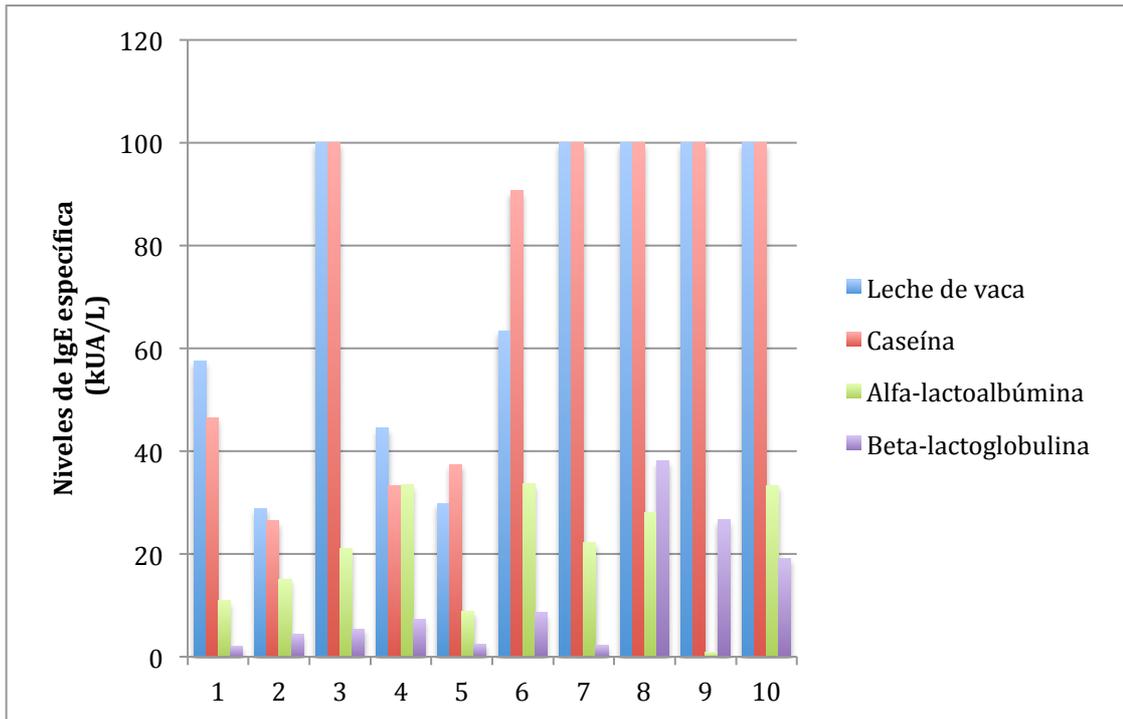
Los pacientes tras completar la primera fase del procedimiento de desensibilización alimentaria continuaban el seguimiento de forma ambulatoria según lo establecido en el protocolo -Ver Métodos- en la consulta de Alergología, con valoración de la evolución clínica e inmunológica.

Siguiendo el protocolo del procedimiento a todos los pacientes se les realizaba determinaciones en sangre de niveles de IgE y de IgG específica a leche de vaca y sus proteínas caseína, alfa-lactoalbúmina y Beta-lactoglobulina. Los resultados han sido registrados de forma sistemática durante un periodo de 3-5 años y los valores obtenidos en cada paciente se exponen en las siguientes tablas de forma esquemática.

4.2.1.-Niveles séricos Basales de IgE específica a Leche: en la siguiente tabla se muestran los valores de IgE específica sérica en kU/L, tanto a leche de vaca nativa como a las 3 proteínas de leche individualizadas analizadas en el momento inicial o basal.

	IgE total	IgE específica (kU/l)			
		UI/ml	Leche de vaca	Caseína	Alfa-Lactoalbúmina
1	1343	57,6	46,4	10,9	2,11
2	255	28,8	26,4	15	4,29
3	375,3	>100	>100	21	5,36
4	52,7	44,5	33,3	33,5	7,25
5	2500	29,8	37,4	8,77	2,5
6	515	63,4	90,7	33,6	8,57
7	1320	>100	>100	22,3	2,25
8	11572	>100	>100	28,1	38,2
9	2510	>100	>100	0,93	26,6
10	3737	>100	>100	33,3	19,1

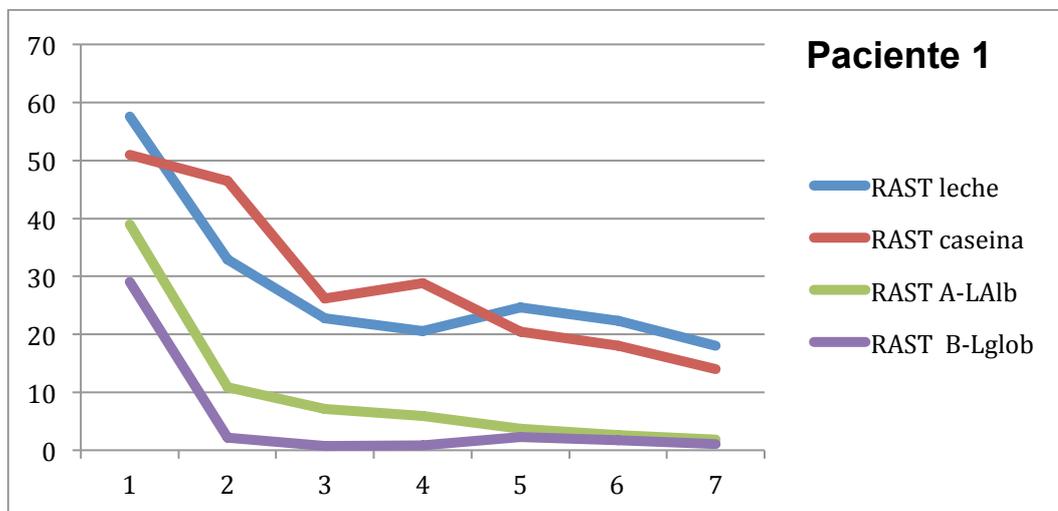
Tabla: Valores basales de IgE total y de IgE específica de los pacientes

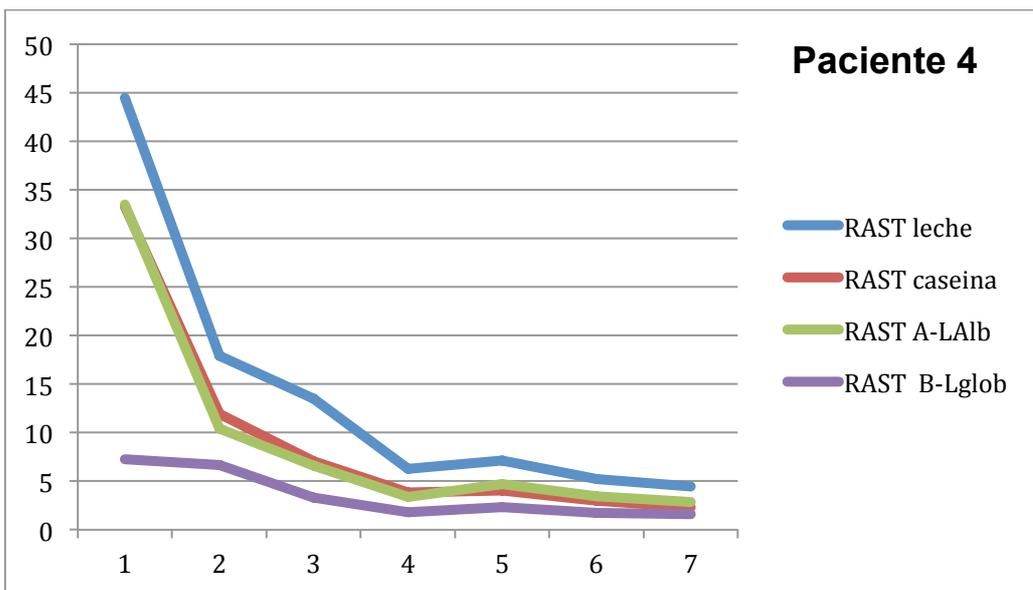
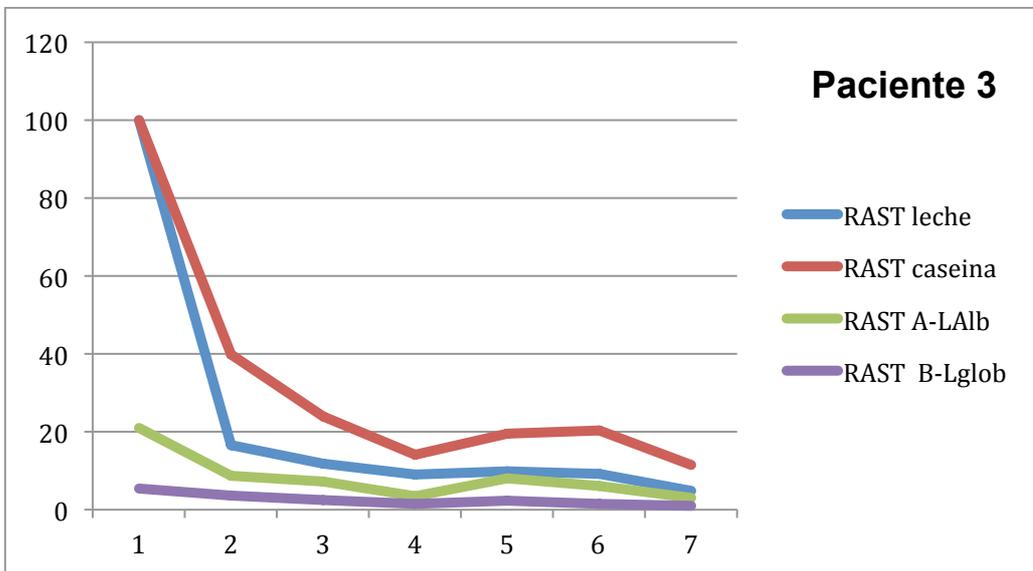
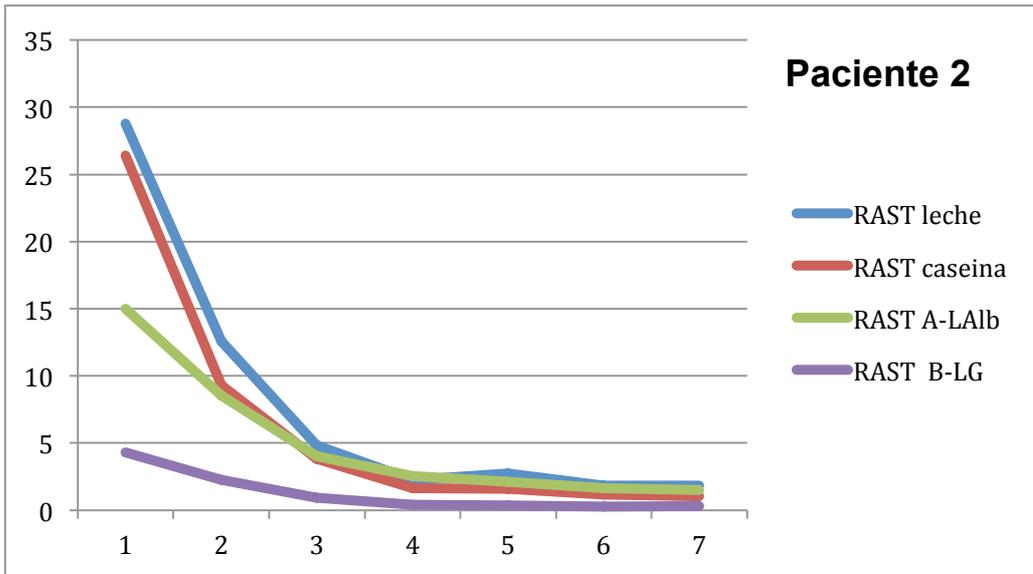


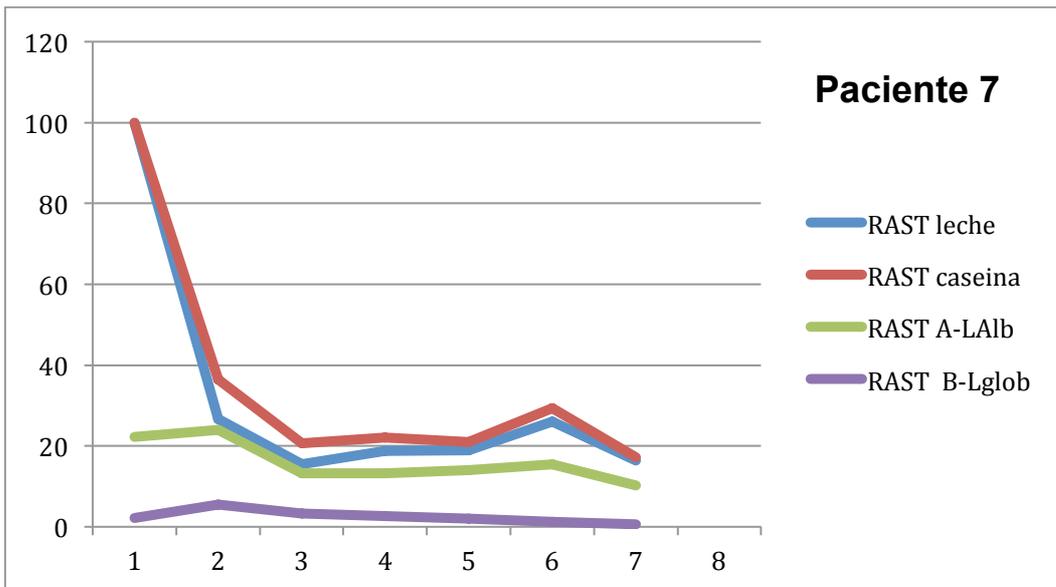
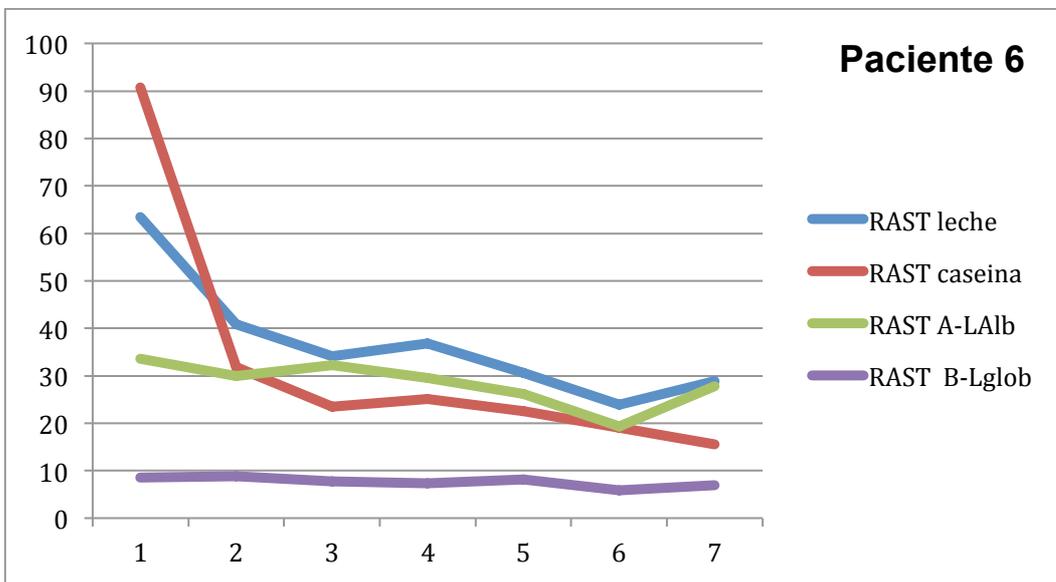
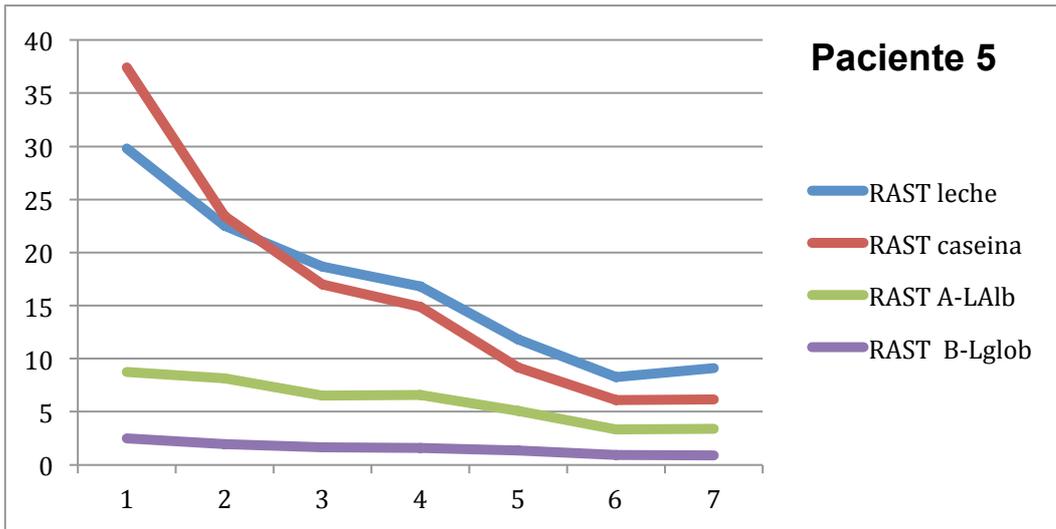
4.2.2.- Evolución inmunológica inicial: valores de los niveles séricos de IgE específica a leche por paciente

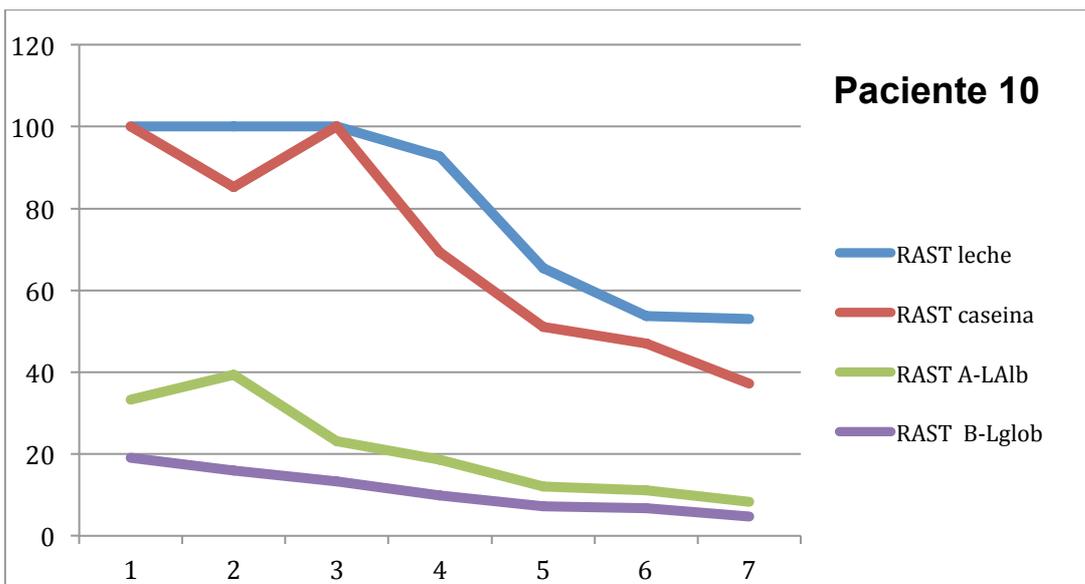
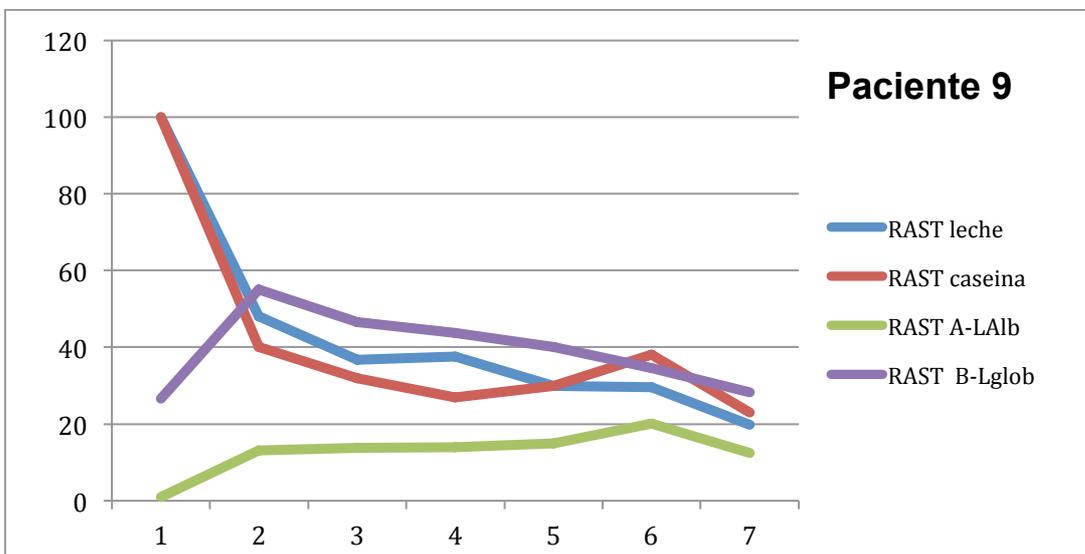
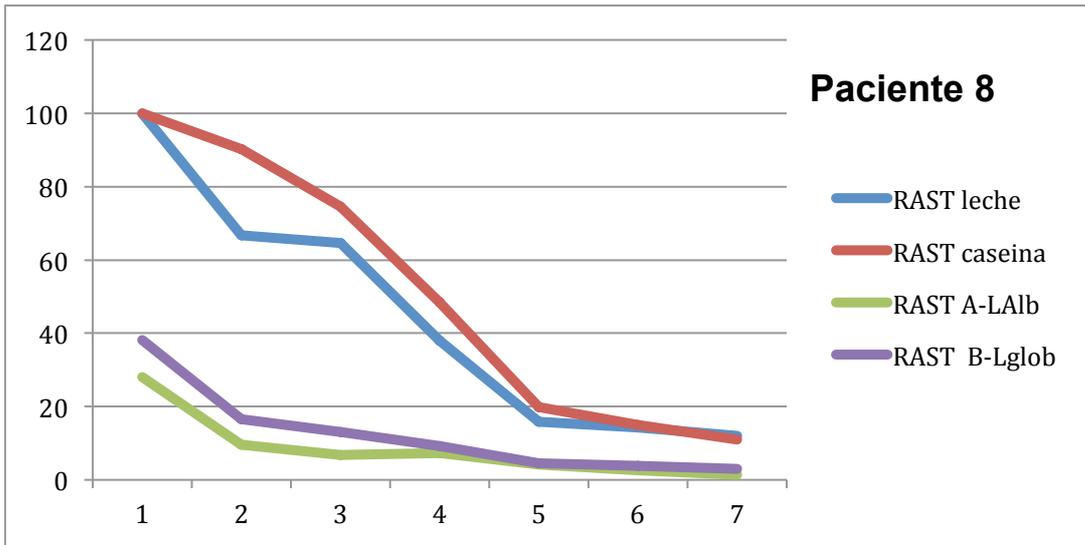
Los valores de IgE específica, históricamente conocido como RAST por sus siglas en inglés RadioAllergoSorbent Test, se determinaron tanto para leche de vaca completa como para sus proteínas individuales en cada revisión semestral en cada uno de los 10 pacientes iniciales. A continuación se detalla la evolución semestral de cada paciente por separado los primeros 3 años.

* (1:basal, 2:6 meses, 3:12 meses, 4:18meses; 5:24 meses, 6:30 meses; 7:36 meses)







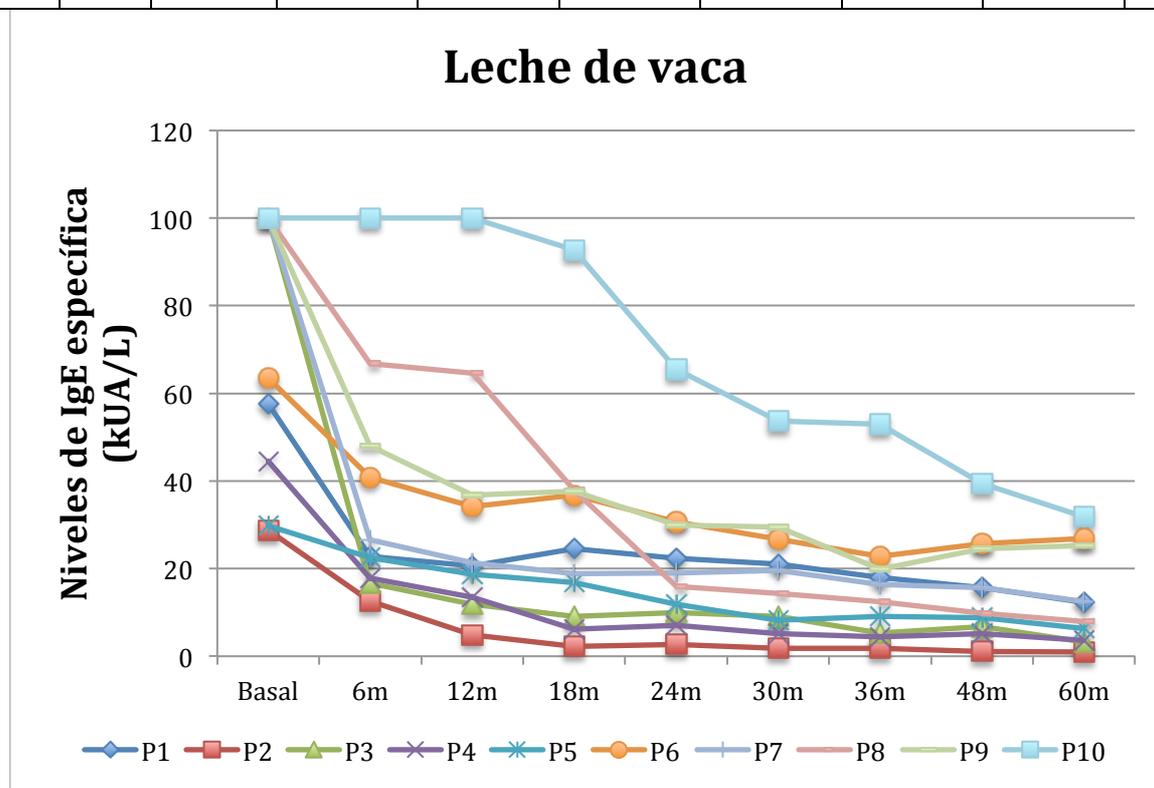


4.2.3.- Evolución a largo plazo: valores de los niveles séricos de IgE específica a leche y proteínas de la leche

En las siguientes tablas y gráficos se expone como evolucionaron los niveles de IgE específica tanto para la leche como para cada una de sus proteínas a lo largo de los siguientes 5 años en cada uno de los pacientes

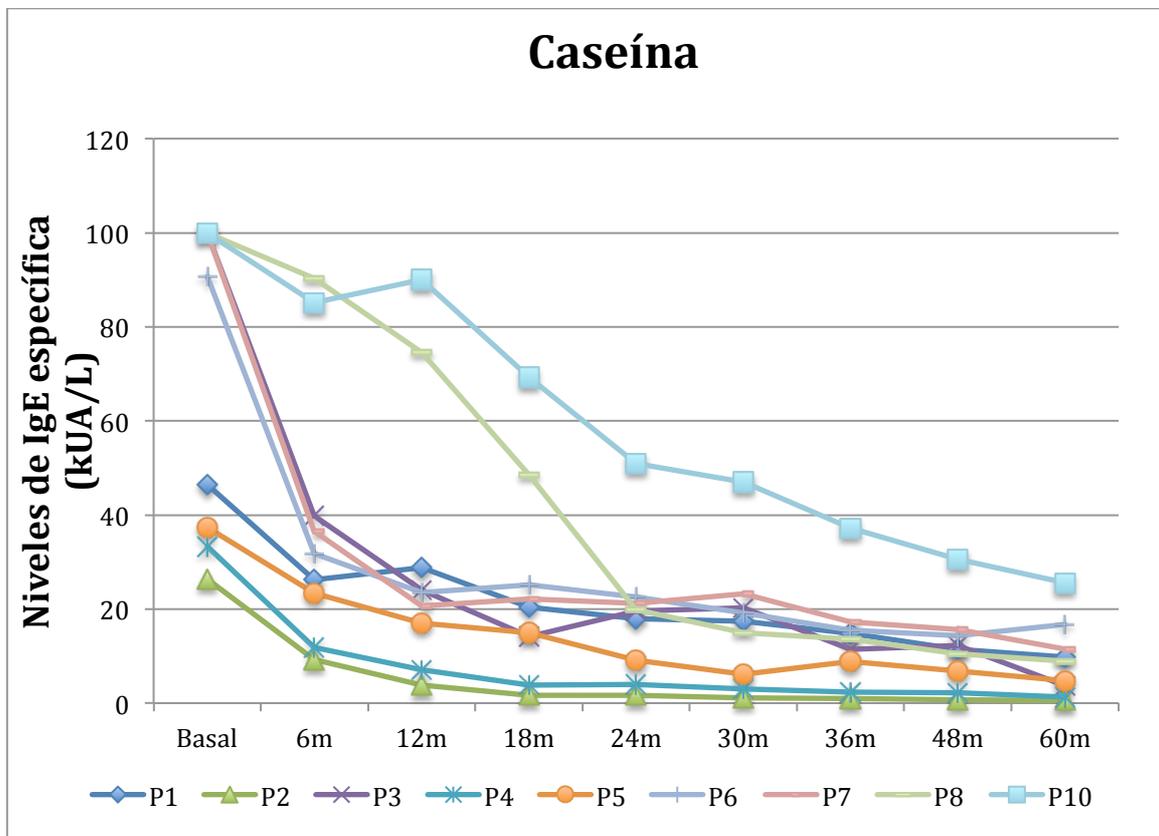
A- IgE específica a Leche de vaca (kU/L):

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses	30 meses	36 meses	48 meses	60 meses
1	57,6	22,8	20,6	24,6	22,3	21	18	15,6	12,3
2	28,8	12,6	4,85	2,26	2,73	1,82	1,8	1,14	0,97
3	100	16,6	11,8	9,04	9,92	9,16	5,32	6,71	3,21
4	44,5	17,9	13,5	6,25	7,1	5,21	4,46	5,2	3,62
5	29,8	22,5	18,7	16,8	11,8	8,27	9,11	8,87	6,26
6	63,4	40,9	34,1	36,8	30,6	26,8	22,8	25,65	26,86
7	100	26,6	21,3	18,8	19,01	19,56	16,43	15,6	12,5
8	100	66,8	64,6	38,01	15,88	14,31	12,5	9,8	7,9
9	100	48	36,8	37,6	30	29,56	19,82	24,5	25,3
10	100	100	100	92,7	65,5	53,7	53	39,4	31,8



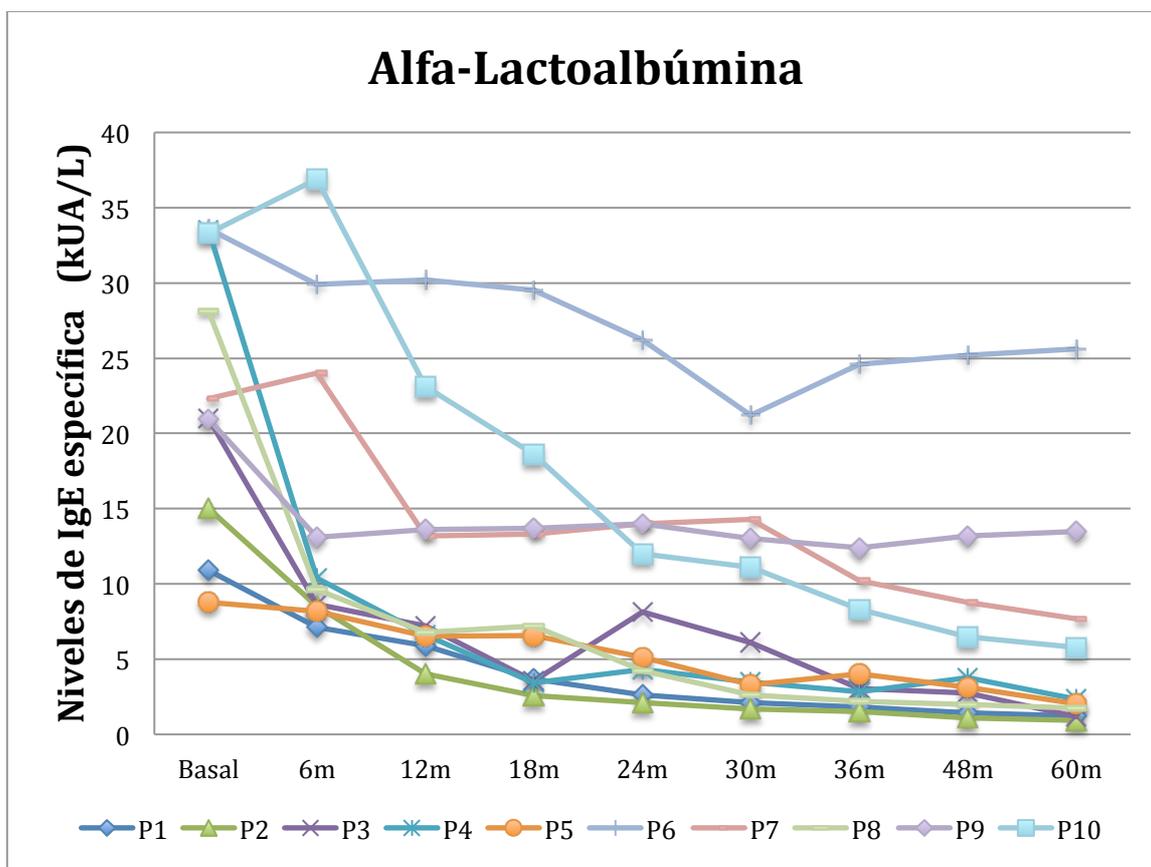
B.- IgE específica a Caseína (kU/L)

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses	30 meses	36 meses	48 meses	60 meses
1	46,4	26,2	28,8	20,4	18	17,4	14,8	11,4	9,8
2	26,4	9,29	3,83	1,66	1,6	1,15	1,05	0,74	0,55
3	100	39,8	24	14,1	19,6	20,3	11,5	12,2	3,73
4	33,3	11,9	7,08	3,83	4,02	2,96	2,32	2,26	1,3
5	37,4	23,4	17	14,9	9,15	6,1	8,9	6,84	4,73
6	90,7	31,8	23,5	25,1	22,6	19,11	15,54	14,34	16,7
7	100	36,5	20,7	22,1	21,2	23,3	17,23	15,6	11,5
8	100	90,3	74,5	48,5	19,91	15,02	13,6	10,5	8,92
9	100	40,1	31,9	26,9	30,1	38,2	23,1	19,4	20,2
10	100	85,2	90	69,3	51	47	37,2	30,6	25,6



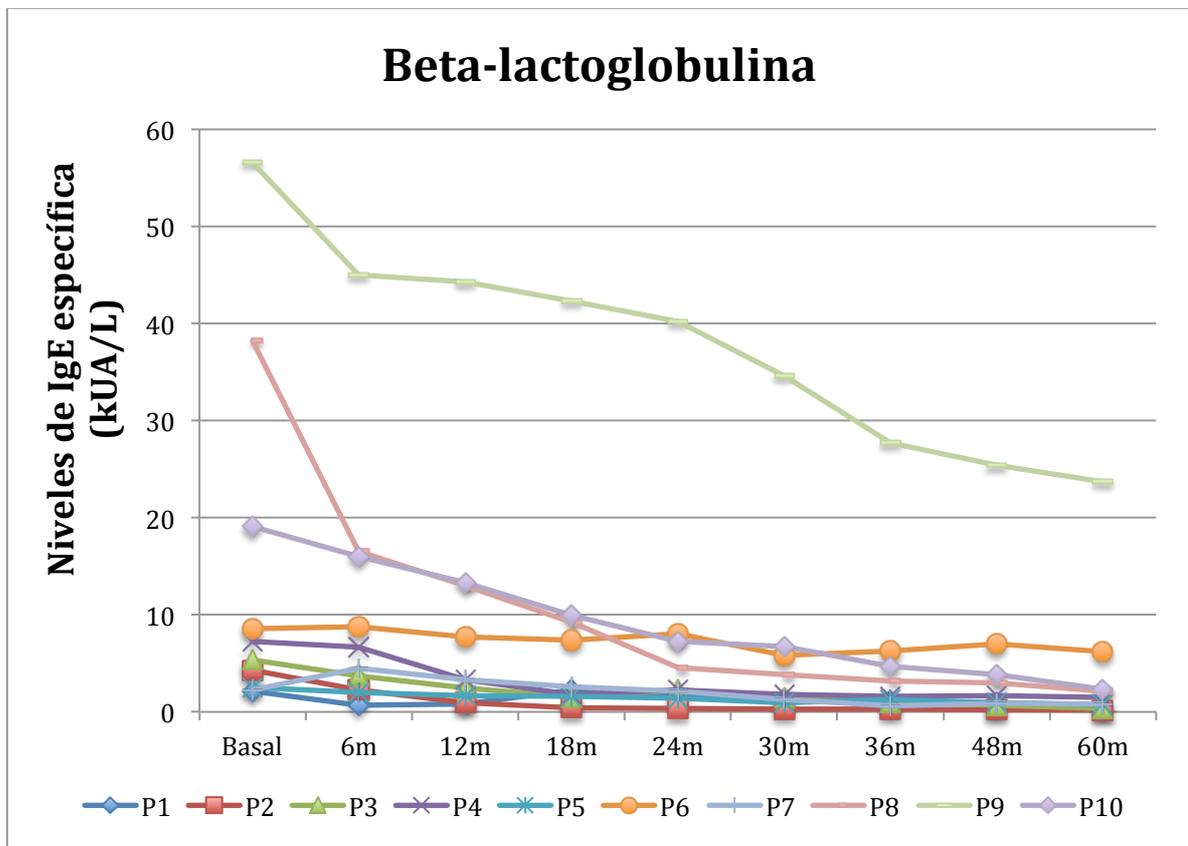
C.- IgE específica a Alfa-lactoalbúmina (kU/L)

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses	30 meses	36 meses	48 meses	60 meses
1	10,9	7,11	5,87	3,67	2,63	2,1	1,81	1,45	1,21
2	15	8,52	4,03	2,56	2,12	1,67	1,51	1,11	0,93
3	21	8,66	7,21	3,54	8,13	6,12	3,04	2,76	1,18
4	33,5	10,4	6,62	3,41	4,3	3,45	2,85	3,78	2,34
5	8,77	8,18	6,54	6,58	5,11	3,32	4,02	3,11	2,03
6	33,6	29,9	30,2	29,5	26,2	21,2	24,6	25,2	25,6
7	22,3	24	13,2	13,3	14	14,3	10,2	8,76	7,68
8	28,1	9,62	6,79	7,2	4,22	2,6	2,21	1,98	1,75
9	20,93	13,1	13,6	13,7	14	13	12,4	13,2	13,5
10	33,3	36,9	23,1	18,6	12	11,1	8,31	6,48	5,78



D.- IgE específica a Beta-lactoglobulina (kU/L)

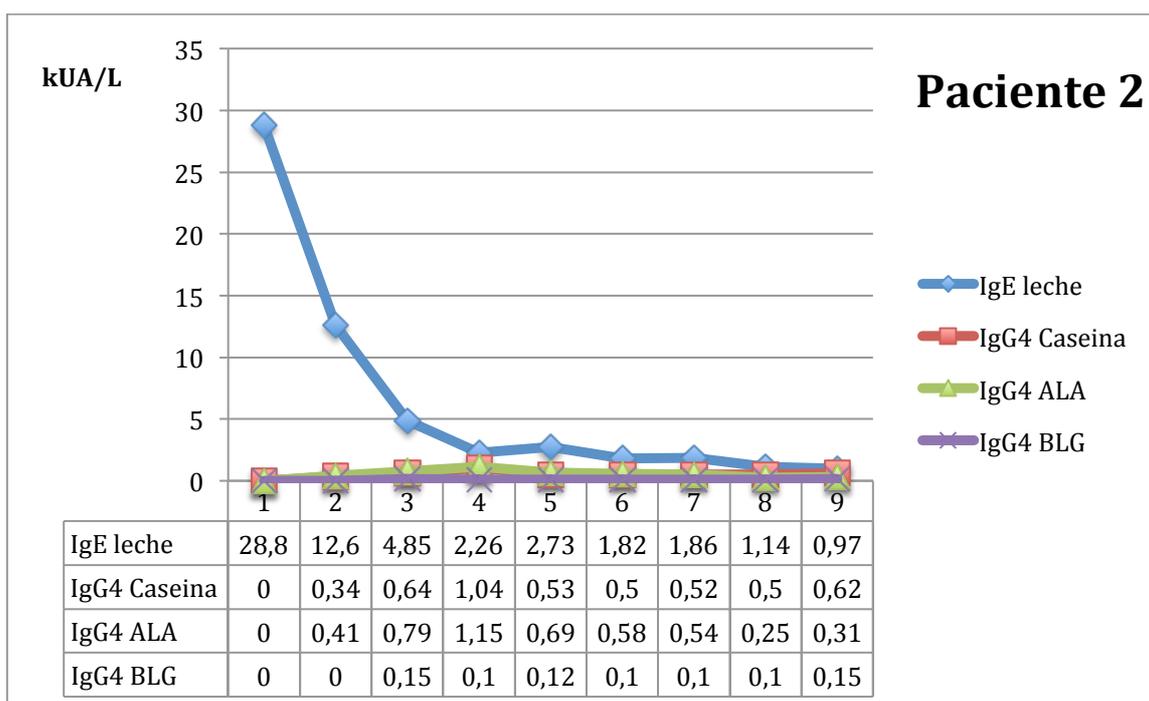
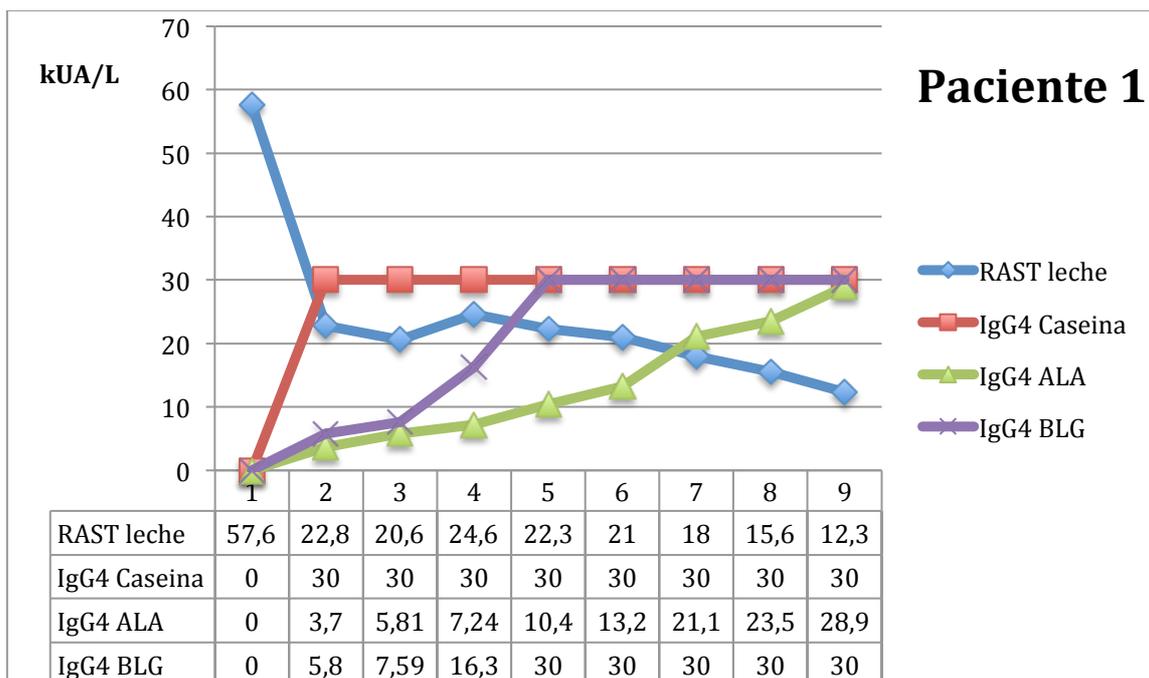
Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses	30 meses	36 meses	48 meses	60 meses
1	2,11	0,71	0,82	2,23	1,74	1,43	1,11	0,92	0,67
2	4,29	2,25	0,93	0,41	0,36	0,28	0,3	0,19	0,17
3	5,36	3,7	2,46	1,52	2,25	1,48	1,01	0,71	0,33
4	7,25	6,68	3,32	1,83	2,23	1,77	1,61	1,7	1,49
5	2,5	1,98	1,65	1,62	1,39	0,92	1,3	0,94	0,75
6	8,57	8,8	7,71	7,37	8,02	5,82	6,3	6,97	6,22
7	2,25	4,5	3,28	2,62	2,1	1,25	0,62	0,87	0,81
8	38,2	16,5	13	9,24	4,59	3,85	3,2	2,97	2,13
9	56,6	45	44,3	42,3	40,2	34,6	27,7	25,4	23,7
10	19,1	16	13,33	9,93	7,27	6,71	4,66	3,81	2,34

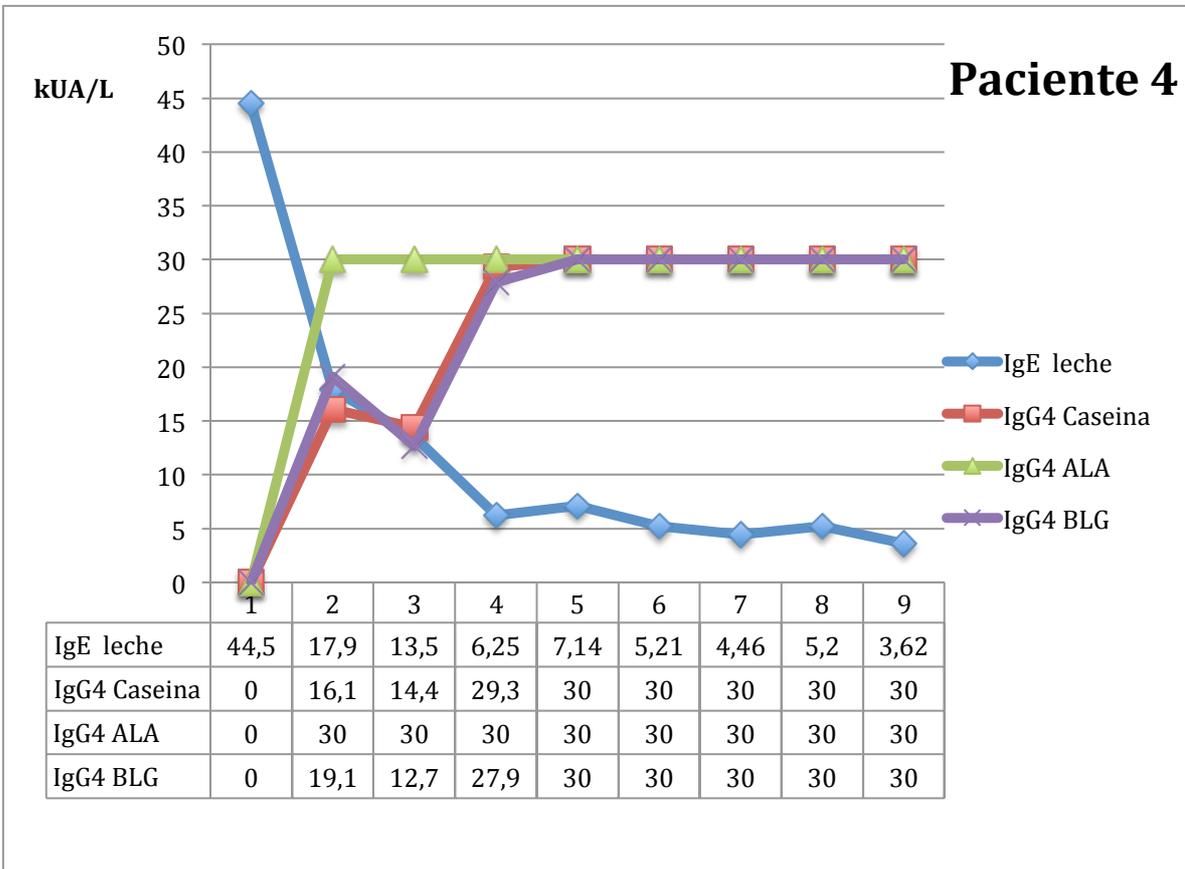
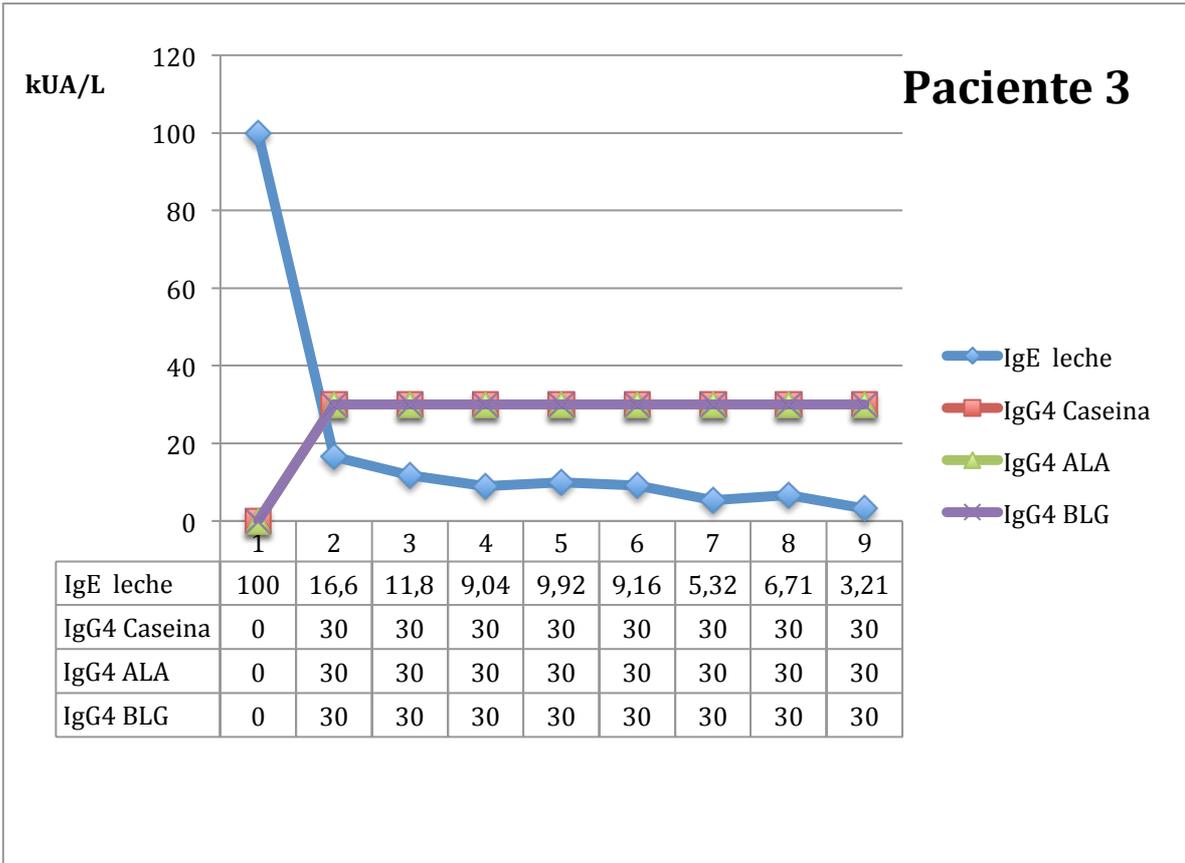


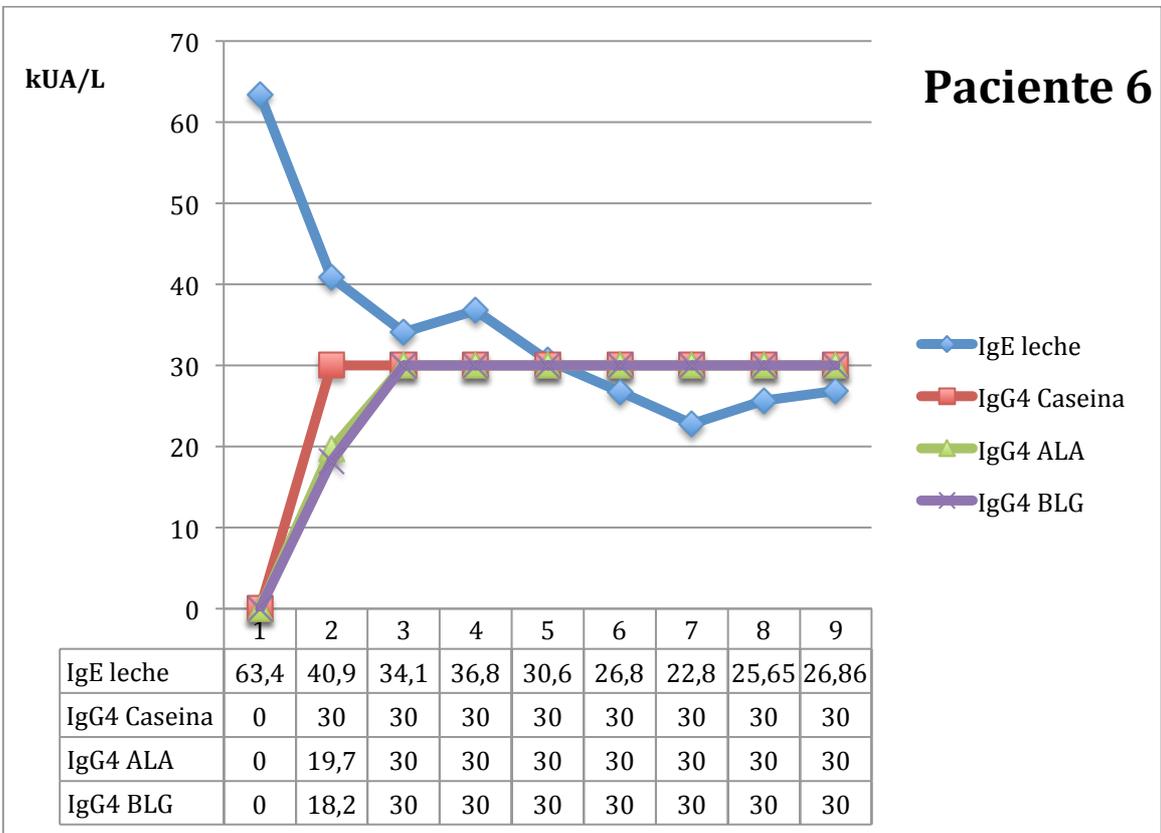
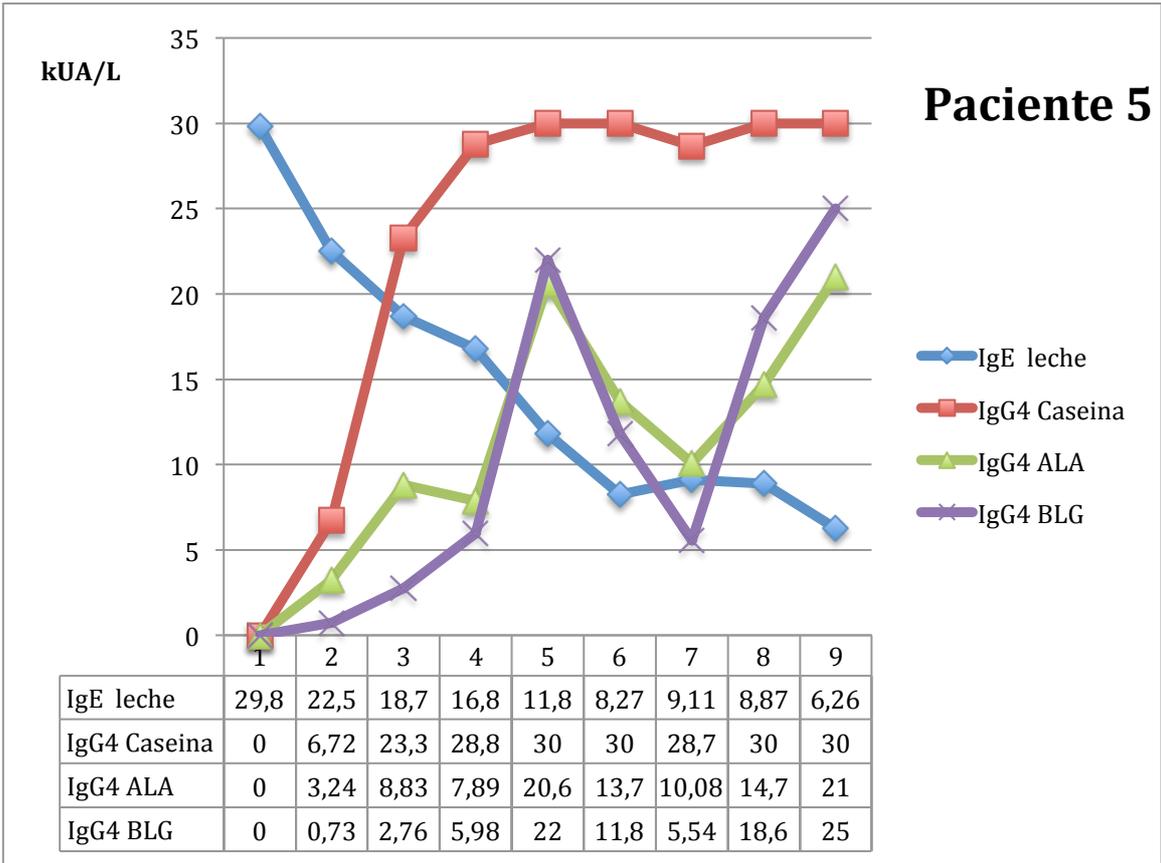
4.2.4.- Evolución de niveles séricos de IgG específica a leche de vaca y proteínas de leche

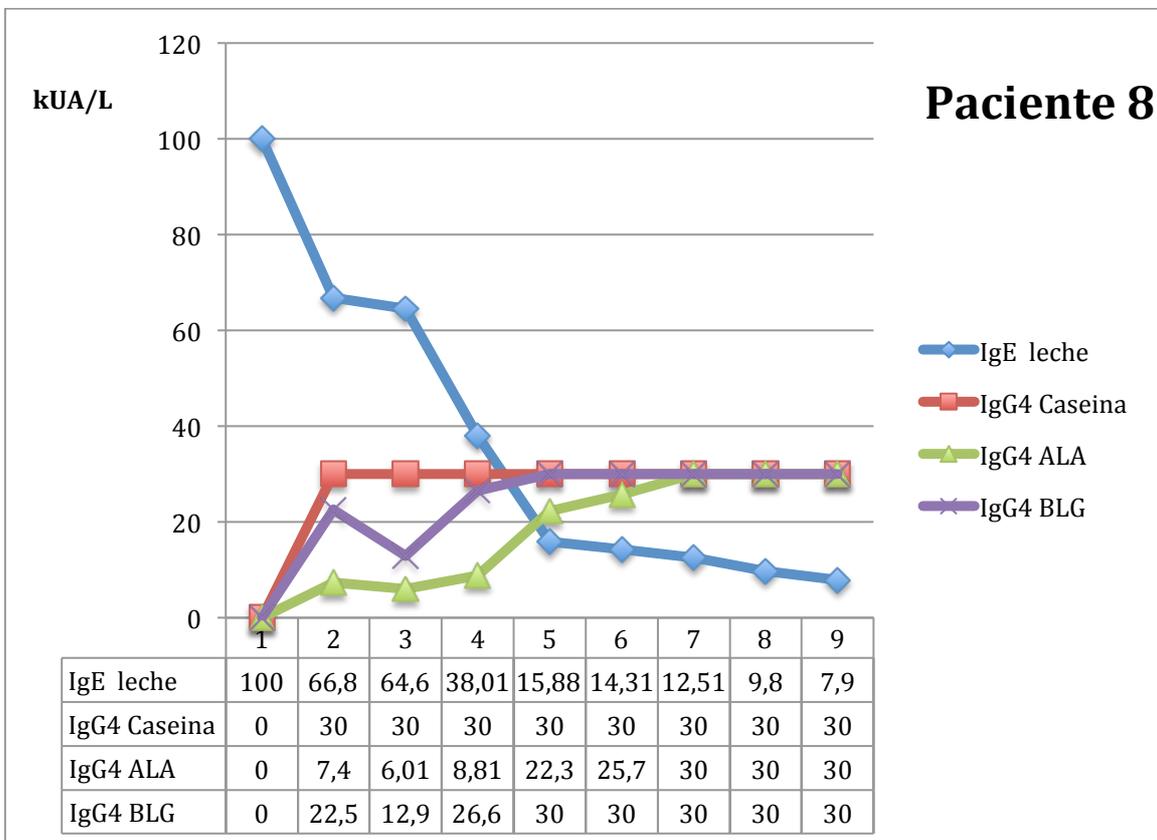
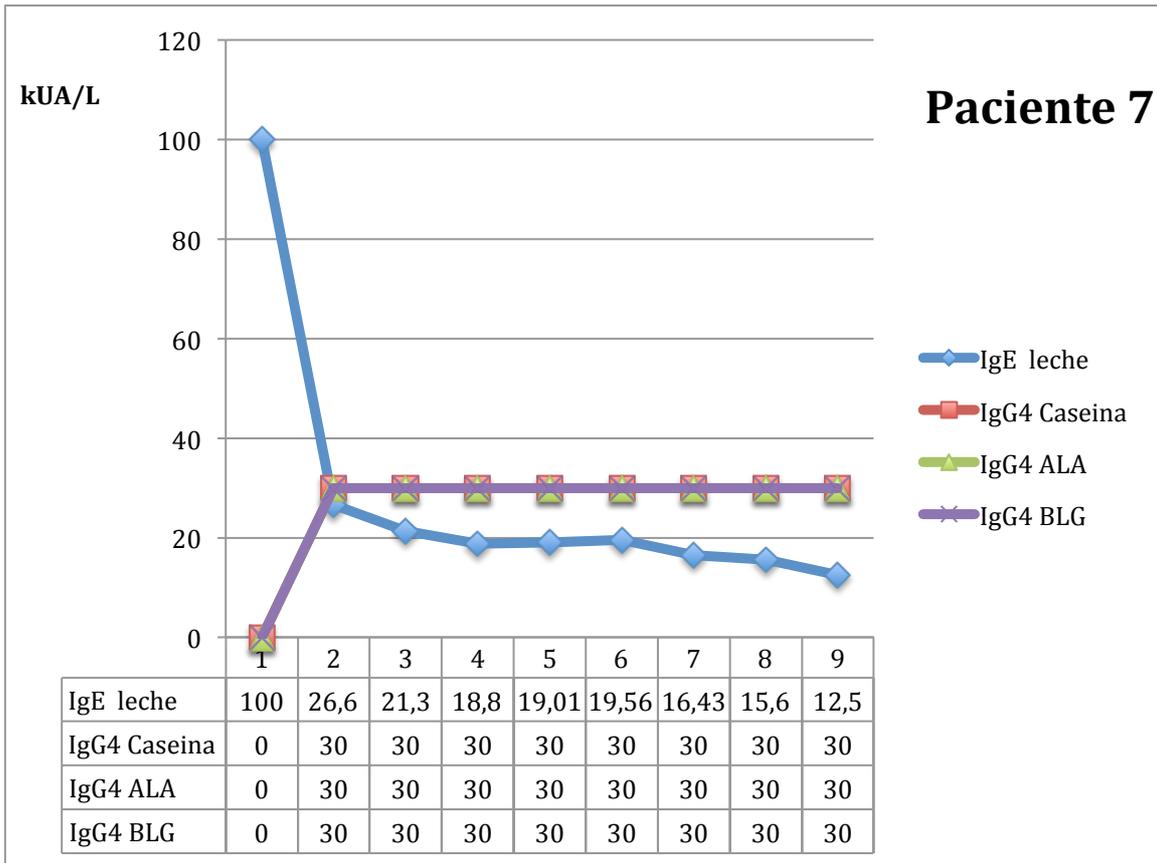
Se exponen los resultados obtenidos de forma semestral para la IgG específica tipo 4 para leche y las proteínas de leche durante 5 años.

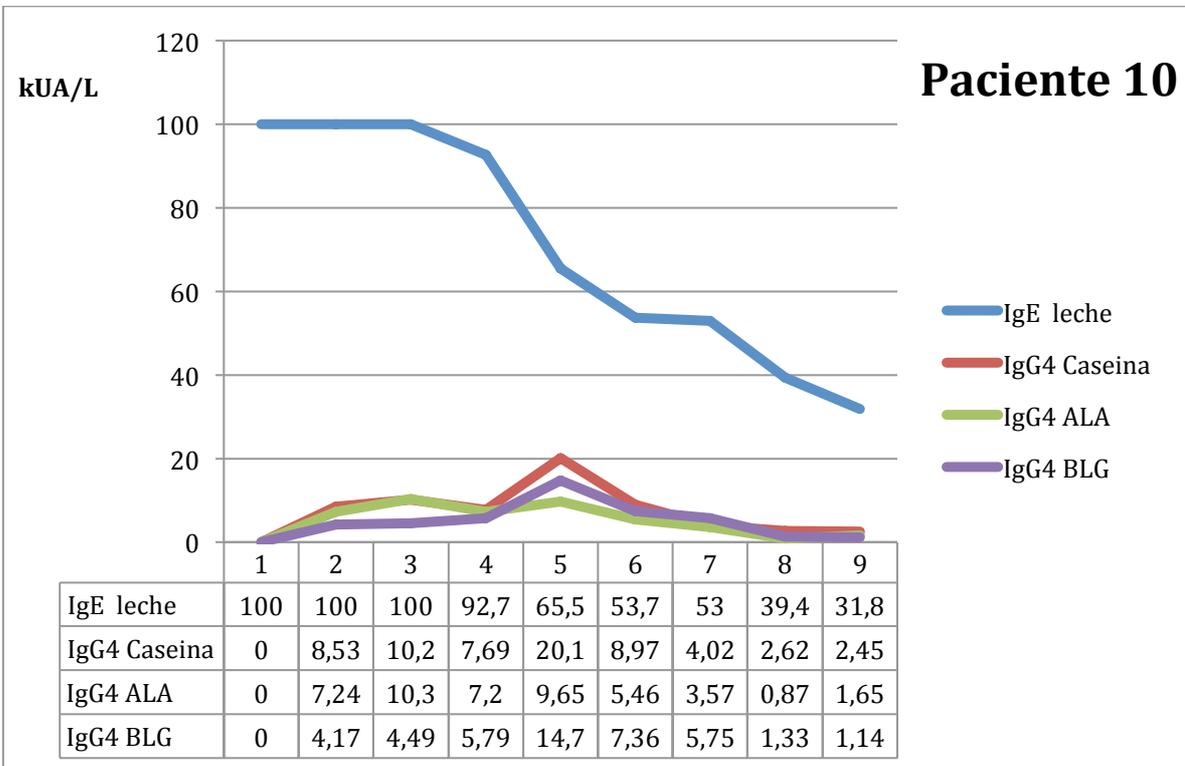
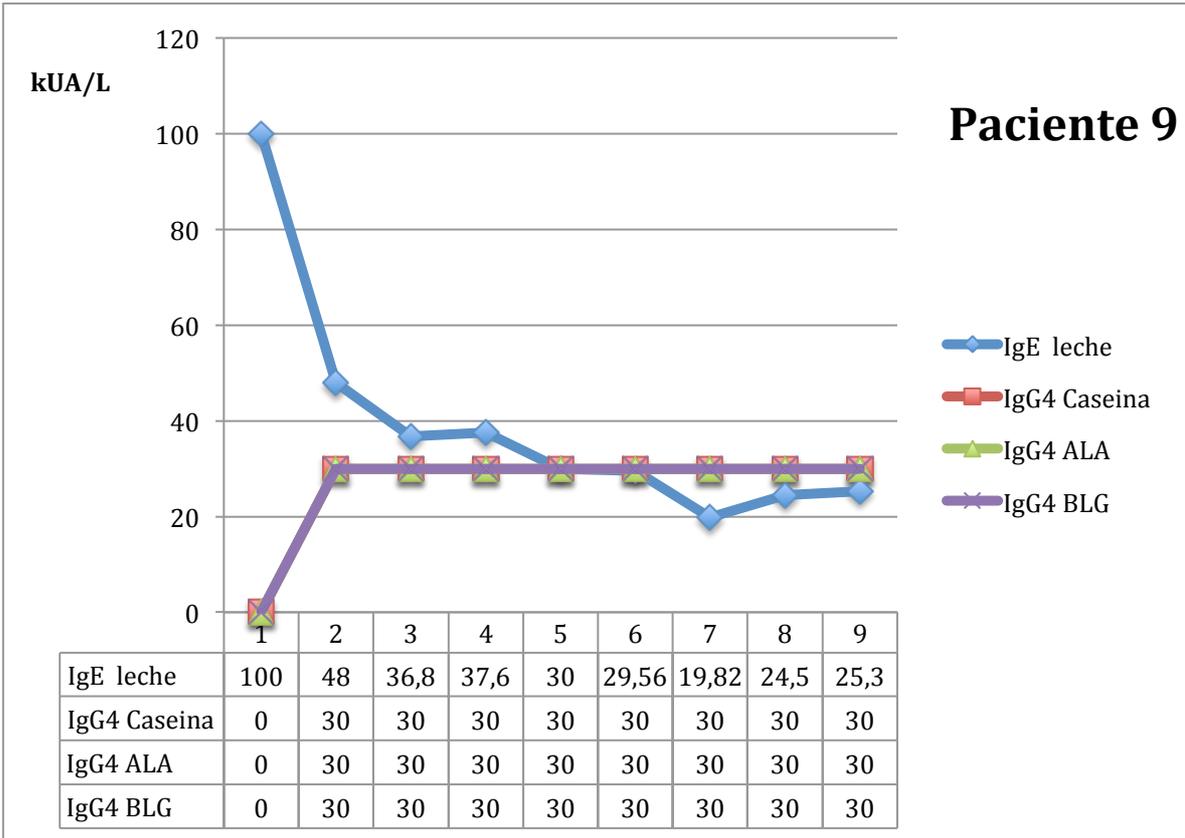
*(1:basal, 2:6 meses, 3:12 meses, 4:18meses; 5:24 meses, 6: 30 meses; 7: 36 meses, 8: 48meses, 9:60 meses)











4.3.- TERCERA FASE DEL ESTUDIO:

Valoración de las reacciones adversas registradas durante la desensibilización con leche, cofactores asociados y posibles medidas para controlarlas.

4.3.1- Reacciones adversas:**A.- Fase de Desensibilización hospitalaria (ver Tablas)**

- Primera fase o rápida, hospitalaria: Los síntomas presentados recogidos fueron
 - sobretodo locales (prurito orofaríngeo):
 - 4/10 el primer día y
 - 9/10 el segundo día.
 - 3/10 casos de urticaria leve (2º día) y 1/10 prurito cutáneo
 - 1/10 caso de urticaria-broncoespasmo leve (2º día).
 - En todos los casos, controlado con tratamiento según protocolo, sólo precisó oxigenoterapia 1 paciente, sin necesidad de permanecer ingresado en UCI al final de la jornada, pudiendo irse de alta al final de la mañana.

CLINICA	Digestiva	Mucosa oral	Prurito cutáneo	Urticaria difusa	Respiratoria
n	0	9	1	3	1
%	0%	90%	10%	30%	10%

Tabla: Reacciones adversas en la 1ª fase de Desensibilización hospitalaria

- Segunda fase o ambulatoria: realizada en la consulta, en el domicilio se registraron reacciones adversas objetivables en todos (100%) los pacientes, recogidas por parte de los progenitores. Estos fueron por lo general leves en las 6-7 semanas de esta fase. En todo momento, estos síntomas fueron informados de modo inmediato y evaluados por parte del médico responsable.

Dentro de las reacciones adversas registradas durante esta etapa, tenemos:

- 1 paciente solo disconfort abdominal
- 5 pacientes: prurito en mucosa orofaringe al principio de cada semana con la nueva dosis, hasta la tercera semana
- 1 paciente: prurito cutáneo difuso y eritema facial en 3 ocasiones durante las primeras 2 semanas.
- 3 pacientes: urticaria difusa leve las primeras 3 semanas durante el principio de cada semana con la nueva dosis.
- 1 paciente rinitis y eritema conjuntival en 2 ocasiones al principio de cada semana.

CLINICA	Digestiva	Mucosa oral	Prurito cutáneo	Urticaria difusa	Rinitis y conjuntivitis
n	1	5	1	3	1
%	10%	50%	10%	30%	10%

Tabla: Reacciones adversas en la 2ª Fase de Desensibilización

B.- Fase de Desensibilización domiciliaria o mantenimiento (ver Tabla)

Los pacientes tras completar el protocolo de desensibilización a leche acuden a revisión mensual durante los primeros 6 meses, y posteriormente semestralmente.

En cada revisión se recogían los datos sobre la incidencia de reacciones adversas del último semestre, clasificadas según tipo e intensidad, se analizaba las circunstancias que rodeaban a cada episodios intentando identificar factores favorecedores o errores cometidos durante la dosificación de la leche.

Se evaluaba si el tratamiento administrado había sido el correcto y se daban las pautas necesarias para evitar nuevos episodios

Nº Pacientes con clínica	Digestiva	Mucosa oral	Cutánea	Respiratoria	Anafilaxia
6 meses					
1ºT	5/10	10/10	4/10	3/10	2/10
2ºT	3/10	8/10	2/10	2/10	1/10
12 meses (1 año)	2/10	5/10	1/10	2/10	0/10
18 meses	2/10	2/10	0/10	1/10	0/10
24 meses (2 años)	2/10	1/10	0/10	1/10	0/10
30 meses	1/10	1/10	1/10	1/10	0/10
36 meses (3 años)	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10
48 meses (4 años)	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10
60 meses (5 años)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Tabla: Reacciones adversas durante la Fase de mantenimiento de la Desensibilización alimentaria

4.3.2.- Tratamiento de reacciones adversas

En todos los casos aplicaron el protocolo entregado de tratamiento de las reacciones adversas, siendo excepcional precisar acudir al servicio de urgencias del centro sanitario más cercano para su control:

- Sólo durante el primer semestre
- Fue necesario en los 2 pacientes que presentaron anafilaxia y los 2 que presentaron urticaria moderada
- un total de 4 visitas el primer trimestre y 2 el segundo trimestre.
- ninguno precisó ingreso hospitalario o en UCI.

Los **tratamientos** más utilizados fueron:

- los antihistamínicos: en casi el 90% de las reacciones
- los corticoides orales: sólo durante el primer año en pacientes con urticaria o broncoespasmo, que supuso menos del 20% de los casos. Los corticoides sistémicos: en los pacientes que acudieron a urgencias de centro sanitario (4 pacientes)
- Beta2-adrenérgicos inhalados: en los 3 pacientes que presentaron exacerbación asmática, sólo en pacientes con asma alérgico ya conocido.
- Adrenalina im (autoinyector): en las 3 episodios registrados fué administrada por los padres según pautas indicadas, y luego el paciente fue trasladado al centro sanitario más próximo. Sólo precisaron una dosis y no hubo complicaciones derivadas de su uso.

Durante los primeros 12 meses el contacto telefónico era lo más habitual, en más del 80% de las reacciones, pero posteriormente los pacientes los controlaban de forma autónoma sin problema según protocolo y los referían en la siguiente revisión en consulta.

En casi el 70% de las llamadas, éstas se producían durante la mañana, pudiendo contactar con el médico responsable en la consulta de Alergología, pero más de un 30% de las llamadas sucedían por la tarde o durante el fin de semana, con lo cuál fue muy útil disponer de un teléfono móvil de contacto las 24 horas donde localizar al médico responsable.

4.3.3.- **Cofactores** asociados:

A.- Fase de Desensibilización hospitalaria (hospitalaria)

En los 3 casos de reacciones cutáneas, como prurito y urticaria generalizada, durante la segunda fase de desensibilización o ambulatoria se detectó la coexistencia de fiebre o febrícula por proceso de infección de vías respiratorias altas o cuadro catarral catarral intercurrente. En el resto de reacciones adversas no pudo identificarse ningún cofactor influyente.

B.- Fase de Desensibilización en domicilio (mantenimiento)

Durante este periodo la frecuencia de reacciones adversas en domicilio fue menor que en la fase inicial u hospitalaria, pero ha sido más frecuente detectar la influencia de diferentes cofactores que influían en el riesgo de presentar las diferentes manifestaciones clínicas tras la ingesta de la dosis de leche.

En este periodo se han podido identificar diversos tipos de factores favorecedores en aproximadamente una tercera parte de los acontecimientos adversos (35%), sobretodo en los casos de urticaria y exacerbación asmática.

La frecuencia relativa de cada uno de ellos aparece reflejado en la siguiente tabla.

COFACTORES	Frecuencia
Anti-inflamatorios	18%
Fiebre ó Infecciones virales	35%
Factores emocionales Estres	22%
Ejercicio	25%

Los **tipos de cofactores** identificados serían los siguientes:

1. **Analgésicos Anti-inflamatorios (AINEs):** el más frecuente ha sido el Ibuprofeno y un solo caso con Naproxeno. Tanto en su uso como analgésico en cefaleas o mialgias, como en su uso como anti-inflamatorio, por inflamación articular o de mucosa respiratoria, etc.
2. **Viriasis y/o Fiebre:** tanto por síndromes febriles con foco respiratorio como gastrointestinal, una vez descartado el uso de AINEs. No se halló relación con uso concomitante de antibióticos, en la mayoría de los casos no tomaban.
3. **Factores emocionales o estrés:** de diferentes tipos pero en general condicionado por la intensidad de éstos, como rabietas o discusiones intensas, estrés por estudios –día pre-examen, final de curso-, estrés familiar -conflictos familiares, separaciones, enfermedades graves-, estrés por crisis económica -ambiente tenso en domicilio-, y por problemas entre amigos -acoso escolar-.
4. **Ejercicio físico:** generalmente en la primera hora después de la ingesta de leche, aunque excepcionalmente hasta en las 2 primeras horas. Sobretudo relacionado con atletismo y fútbol.

4.4.- CUARTA FASE DEL ESTUDIO:

Búsqueda de posibles biomarcadores útiles en el seguimiento del procedimiento de desensibilización alimentaria con leche.

Basándonos en los resultados previos se realizó un nuevo ensayo ampliando la muestra para analizar otros posibles marcadores biológicos que nos permitieran evaluar la respuesta inmunológica de estos pacientes.

(Comité de Ética CHUNSC: 35/2011, ver Anexo 3).

Los grupos estudiados son:

-Grupo Activo: Pacientes diagnosticados de alergia alimentaria persistente a proteínas de leche de vaca mediante los criterios clínicos y serológicos, según protocolo -ver Métodos-.

-Grupo Control: Se seleccionaron pacientes sin antecedentes de alergia alimentaria, que acudían a la consulta de Alergología por un cuadro de posible alergia a medicamentos.

Se realizaron las determinaciones séricas tanto de forma basal como en cada una de las revisiones semestrales que seguían habitualmente los pacientes. Se utilizó en este caso el kit Procarta® Cytokine Assay -ver Métodos- que era analizado a través del citómetro Luminex® -ver Métodos-.

Los resultados obtenidos más significativos en estos pacientes son expuestos en las siguientes tablas

4.4.1.- Beta-NGF

(*ND: no determinado)

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	*ND	124,8	142,95	135,6	145,9
P2	128	114,58	159,93	124,51	50,94
P3	338,06	238,02	0,00	265,34	*ND
P4	0,00	133,94	30,70	0,00	124,51
P5	175,80	312,44	80,48	175,80	0,00
P6	417,02	455,01	438,39	502,63	408,26
P7	119,61	231,67	80,48	231,5	120,1
P8	190,76	175,80	167,99	268,25	140,1
P9	42,7	45,2	50,94	65,8	*ND
P10	50,94	225,20	159,93	185,6	167,99
P11	184,7	175,80	104,05	159,93	132,4
P12	*ND	133,94	225,20	86,76	104,05
Media	129,22	183,03	136,75	151,24	122,25
Desv.std	151,07	125,95	115,05	151,87	140,95

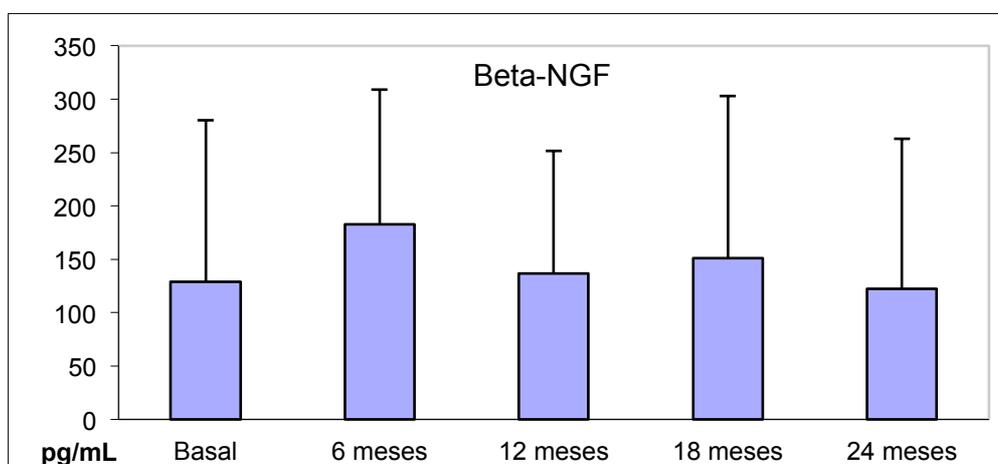
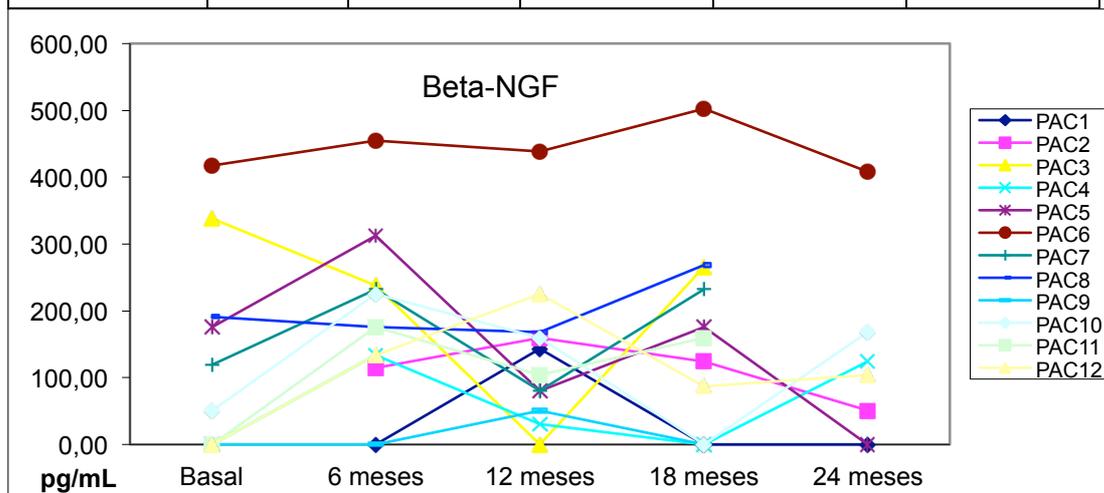


Tabla: Valores medios y desviación estándar de B-NGF

4.4.2.- EOTAXINA

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	43,33	82,15	152,43	61,33	45,33
P2	209,12	211,80	242,20	169,12	197,75
P3	406,23	284,65	94,89	274,75	110,8
P4	77,47	118,87	59,67	33,68	63,81
P5	206,41	196,44	57,43	151,98	144,88
P6	171,80	165,54	122,21	138,41	152,43
P7	259,59	180,45	179,34	190,77	130,2
P8	262,29	179,34	149,24	171,35	125,5
P9	77,20	42,64	80,34	21,29	75,3
P10	68,43	119,35	112,13	32,72	161,72
P11	196,88	83,45	151,06	142,81	158,6
P12	109,95	45,33	124,58	53,75	116,23
Media	183,63	142,50	127,13	120,16	126,02
Desv.std	107,31	73,16	52,71	78,93	54,70

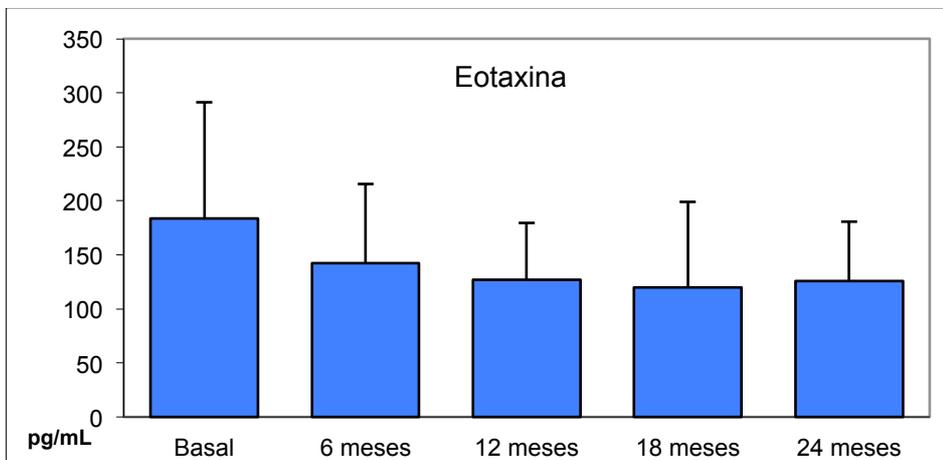
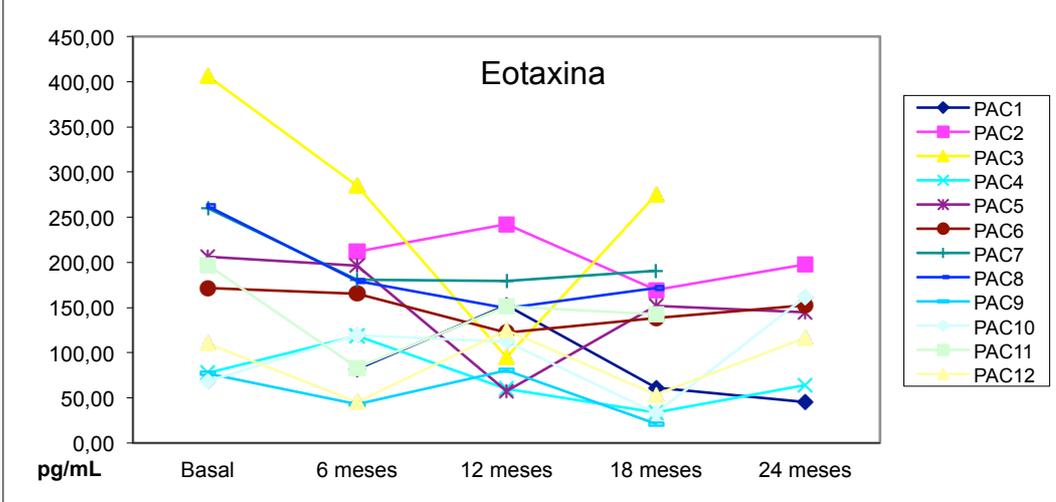


Tabla: Valores medios y desviación estándar de Eotaxina.

4.4.3.- IL-12 p40

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	*ND	21,68	30,57	14,47	12,83
P2	23,1	28,08	17,11	15,07	19,16
P3	115,66	109,65	76,59	70,72	*ND
P4	34,65	50,39	27,61	30,11	27,93
P5	66,72	43,87	41,15	55,52	56,50
P6	35,68	26,37	30,11	22,83	21,29
P7	48,86	36,07	54,21	32,77	31,0
P8	113,35	86,77	90,54	87,45	86,67
P9	16,88	12,08	18,10	10,08	*ND
P10	30,26	26,68	24,21	12,68	22,06
P11	69,22	41,39	47,24	38,53	42,33
P12	96,39	49,91	63,07	38,37	39,72
Media	62,77	44,41	43,38	35,72	28,50
Desv.std	35,63	28,06	23,62	24,46	14,92

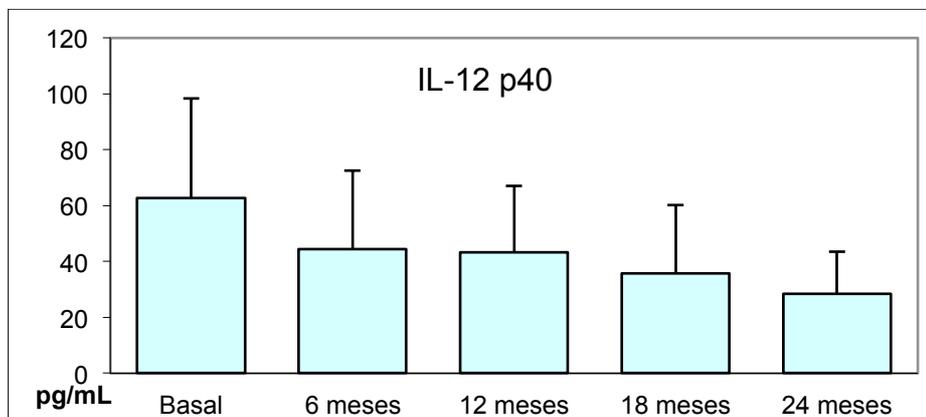
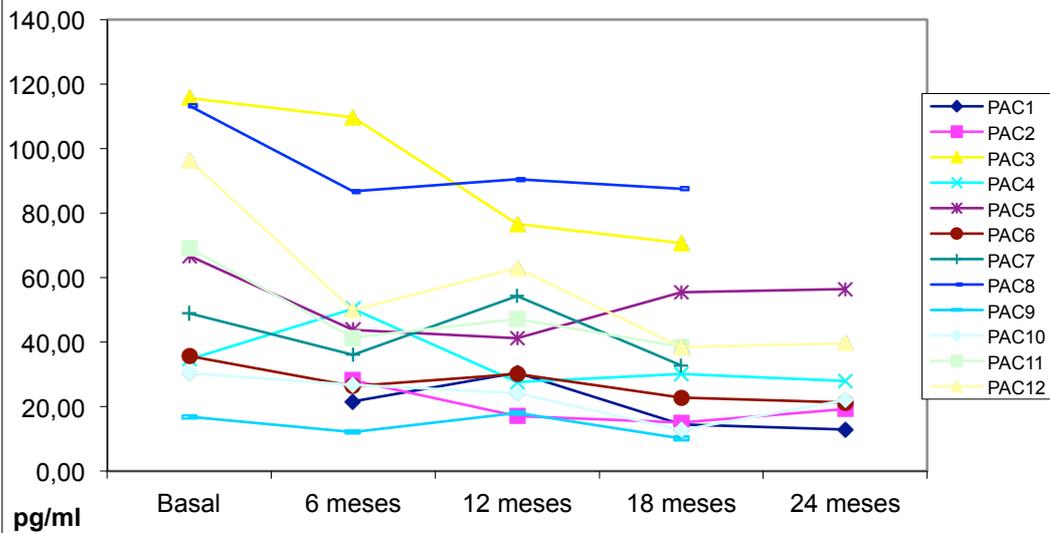


Tabla: Valores medios y desviación estándar de IL-12p40

4.4.4.- IP-10

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	*ND	117,82	313,2	69,57	52,22
P2	205	193	170,64	127,78	145,12
P3	370,81	800,88	61,09	255,61	*ND
P4	166	258,69	150,57	78,55	126,37
P5	242,65	778,71	76,13	305,11	225,83
P6	255,31	254,08	160	154,63	204,02
P7	490,04	154,29	274,58	630,13	254,3
P8	459,78	274,58	269,09	280,65	247,2
P9	165,34	74,51	173,6	33,75	*ND
P10	205,94	248,53	138,94	60,22	227,08
P11	896,79	206,57	870,76	99,47	184,1
P12	919,62	278,83	264,2	189,58	146,15
Media	417,23	313,41	243,57	190,42	160,97
Desv.std	282,75	244,87	212,86	165,42	63,15

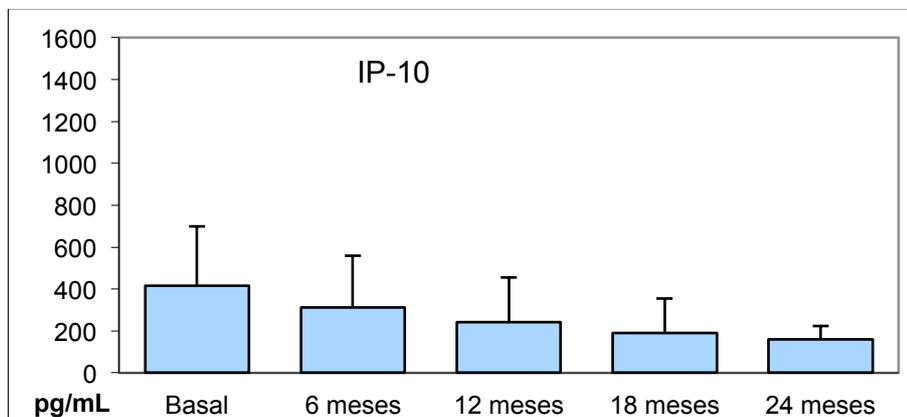
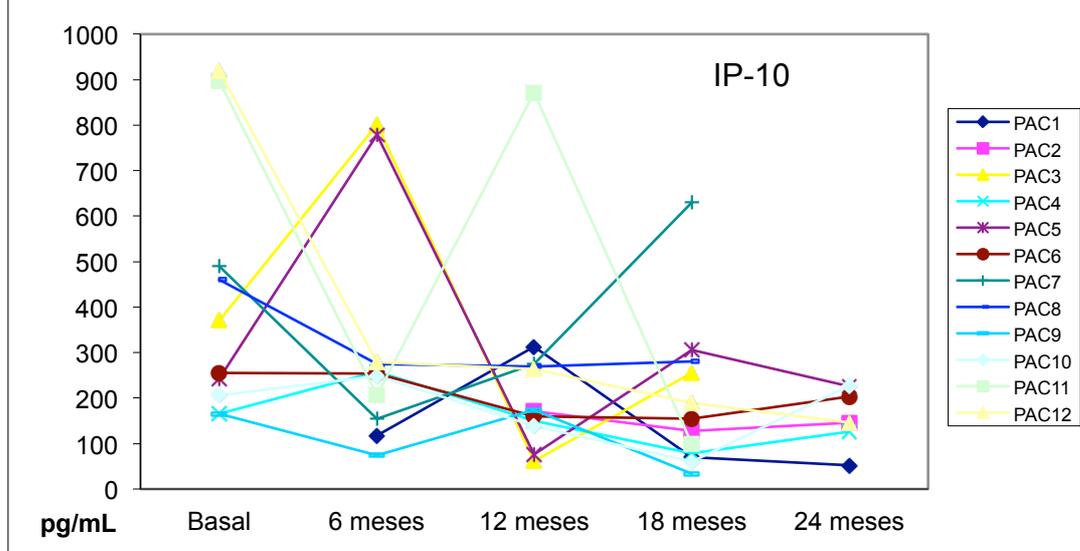


Tabla: Valores medios y desviación estándar de IP-10

4.4.5.- MCP-1

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	*ND	4,97	12,94	6,52	31,2
P2	10,5	14,78	30,28	49,26	114,72
P3	11,12	7,94	5,53	6,38	*ND
P4	12,35	31,35	19,68	10,25	14,78
P5	33,04	85,11	43,76	80,46	115,85
P6	16,85	12,43	12,43	9,23	8,01
P7	10,1	7,51	14,5	19,3	21,3
P8	8,09	7,37	5,95	7,37	18,97
P9	4,27	8,01	19,08	15	*ND
P10	3,72	8,66	40,32	78,81	110,21
P11	5,67	11,7	10,83	40,16	47,2
P12	5,67	4,27	5,39	18,63	4,13
Media	11,09	17,01	18,74	28,45	56,99
Desv.std	8,73	22,60	13,70	27,44	53,65

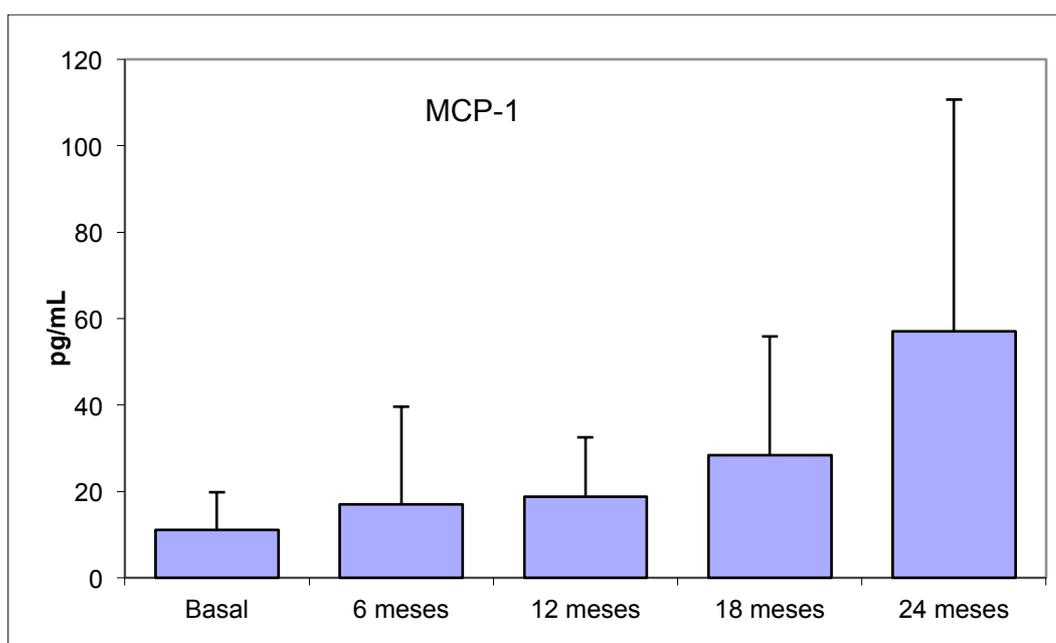


Tabla: Valores medios y desviación estándar de MCP-1

4.4.6.- MIP1-alpha

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	*ND	4,85	14,80	6,99	33,79
P2	11,3	16,85	32,88	51,08	111,71
P3	12,69	8,84	5,65	6,80	*ND
P4	14,13	33,94	22,13	11,66	16,85
P5	35,59	84,27	45,88	79,99	112,77
P6	19,11	14,21	14,21	10,44	8,93
P7	11,49	8,29	13,5	21,74	27,5
P8	9,02	8,11	6,23	8,11	9,3
P9	3,82	8,93	21,50	17,10	*ND
P10	2,95	9,74	42,61	78,47	107,51
P11	5,84	13,37	12,35	42,47	65,7
P12	5,84	3,82	5,45	21,03	3,61
Media	12,05	17,94	34,99	29,66	56,45
Desv.std	9,69	22,33	52,61	27,01	51,58

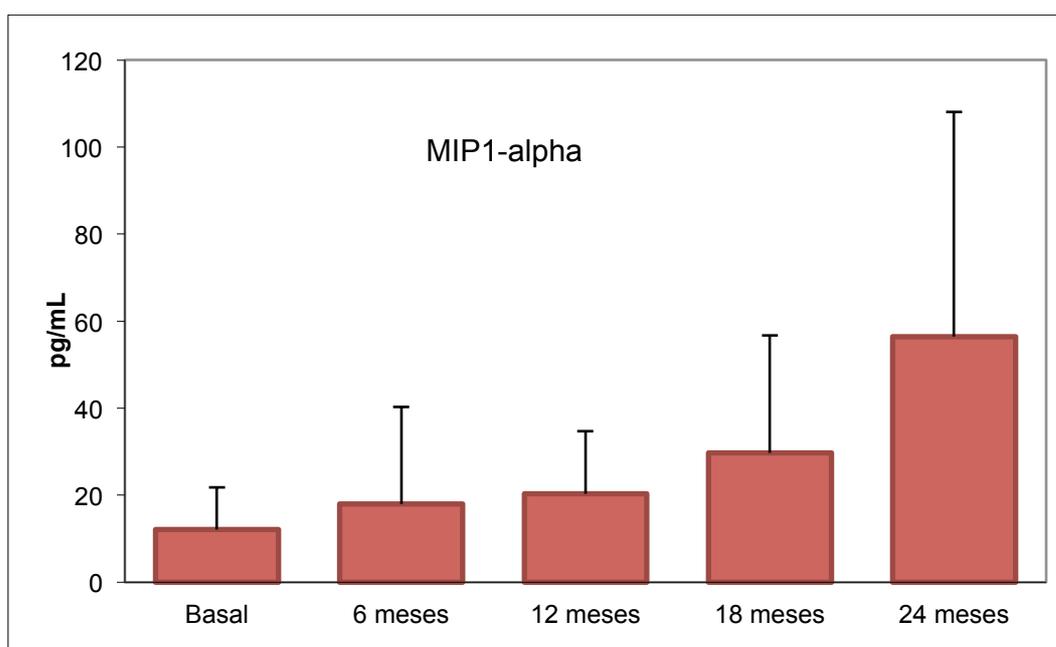


Tabla: Valores medios y desviación estándar de MIP1-Alfa

4.4.7.- PDGF-BB

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	*ND	128,88	135,83	85,80	100,47
P2	794,5	709,45	775,01	514,00	759,03
P3	2933,06	530,90	256,97	509,77	*ND
P4	1318,73	1118,19	589,42	423,85	1187,58
P5	860,81	988,03	387,30	868,67	1999,93
P6	546,31	210,84	135,83	123,64	218,90
P7	971,28	511,18	675,67	605,99	537,8
P8	1106,79	995,74	839,80	1118,19	824,2
P9	428,21	238,05	318,60	271,01	*ND
P10	407,83	209,22	93,18	25,86	269,46
P11	1965,26	2566,30	1659,52	1347,25	1135,7
P12	168,12	156,35	176,46	120,12	228,50
Media	1070,64	696,93	503,63	501,18	680,55
Desv.std	838,46	688,07	448,67	425,12	698,45

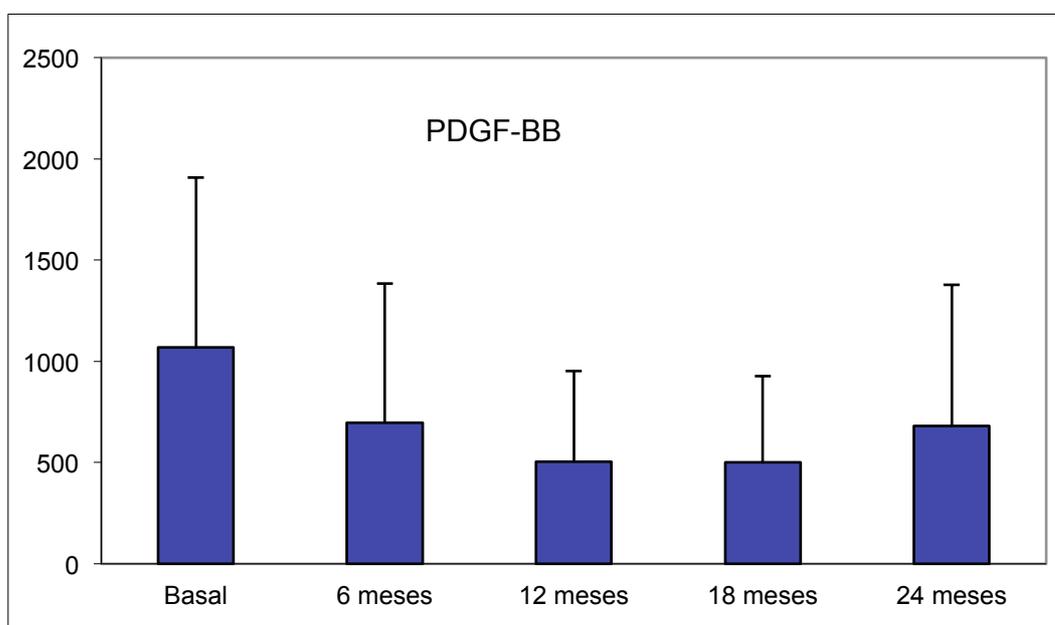


Tabla: Valores medios y desviación estándar de PDGF-BB

4.4.8.- VEGF-A

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	*ND	28,14	77,77	9,44	23,31
P2	178,4	153,23	164,61	126,96	230,39
P3	953,02	360,78	320,11	328,21	*ND
P4	48,13	462,15	65,41	39,68	34,69
P5	245,15	230,39	110,33	199,19	358,74
P6	136,29	44,73	103,01	54,98	44,73
P7	110,33	61,92	68,92	12,42	10,5
P8	218,64	114,93	112,17	141,92	136,2
P9	13,94	4,45	23,31	9,44	*ND
P10	48,13	75,99	95,73	115,85	203,06
P11	197,25	246,14	161,76	273,92	189,2
P12	119,55	224,51	298,94	104,84	102,10
Media	209,04	167,28	133,51	118,07	142,43
Desv.std	272,42	141,78	91,14	104,77	125,94

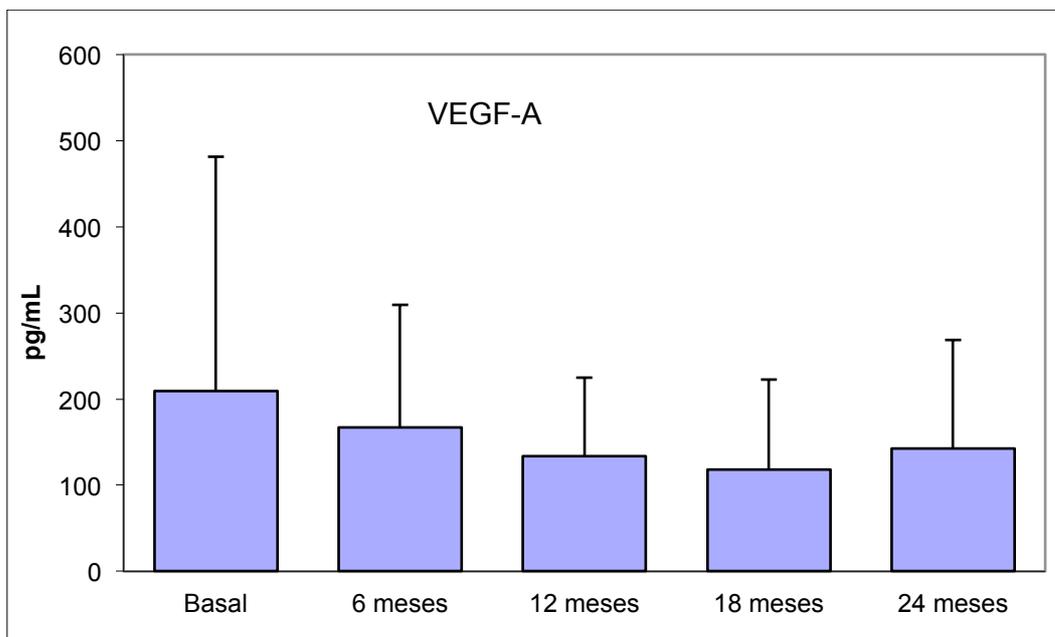


Tabla: Valores medios y desviación estándar de VEGF-A

4.4.9.- GM-CSF

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	*ND	12,0	18,0	4,0	5,0
P2	*ND	28,0	19,0	19,0	14,0
P3	47,5	38,0	9,0	87,0	*ND
P4	7,0	17,0	10,5	8,0	12,0
P5	19,0	38,0	8,0	19,5	10,0
P6	73,0	74,0	71,0	65,5	42,0
P7	15,0	37,0	15,0	33,0	16,3
P8	26,0	25,0	27,5	42,0	31,2
P9	5,0	7,0	11,0	6,0	*ND
P10	9,0	24,5	16,5	8,0	19,0
P11	10,0	23,0	15,0	22,0	12,1
P12	8,0	17,0	35,0	16,0	13,0
Media	21,95	28,38	21,29	27,50	16,43
Desv.std	21,98	17,53	17,49	25,76	12,04

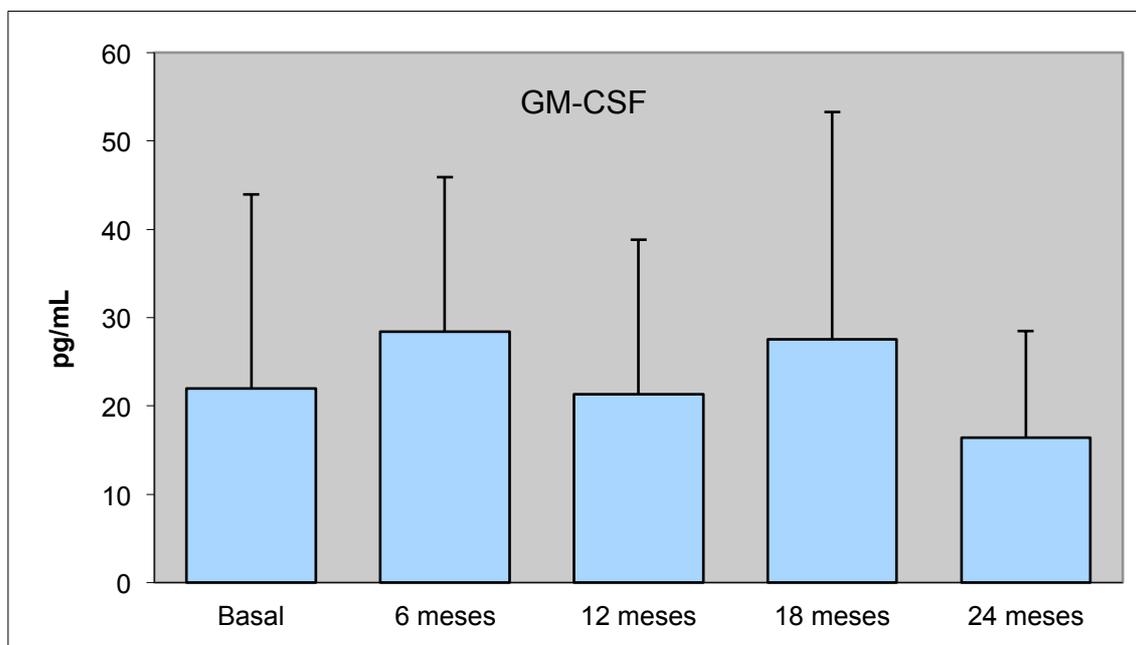


Tabla: Valores medios y desviación estándar de GM-CSF

4.4.10.- IL-1Beta

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	*ND	23,0	26,5	14,0	14,0
P2	22,1	21,0	20,0	16,0	14,0
P3	45,5	27,0	17,5	31,0	*ND
P4	18,0	19,0	16,0	41,0	30,0
P5	37,0	56,0	20,0	32,0	24,0
P6	47,0	42,0	39,0	33,0	21,0
P7	40,0	36,0	31,0	27,0	24,1
P8	42,0	35,5	39,0	33,0	29,3
P9	13,0	12,0	17,0	11,0	*ND
P10	18,0	30,0	24,0	16,0	29,0
P11	23,5	22,0	20,0	17,5	16,3
P12	26,0	30,0	32,0	21,0	23,0
Media	31,00	29,46	24,64	24,38	22,14
Desv.std	12,68	11,80	8,48	9,63	6,41

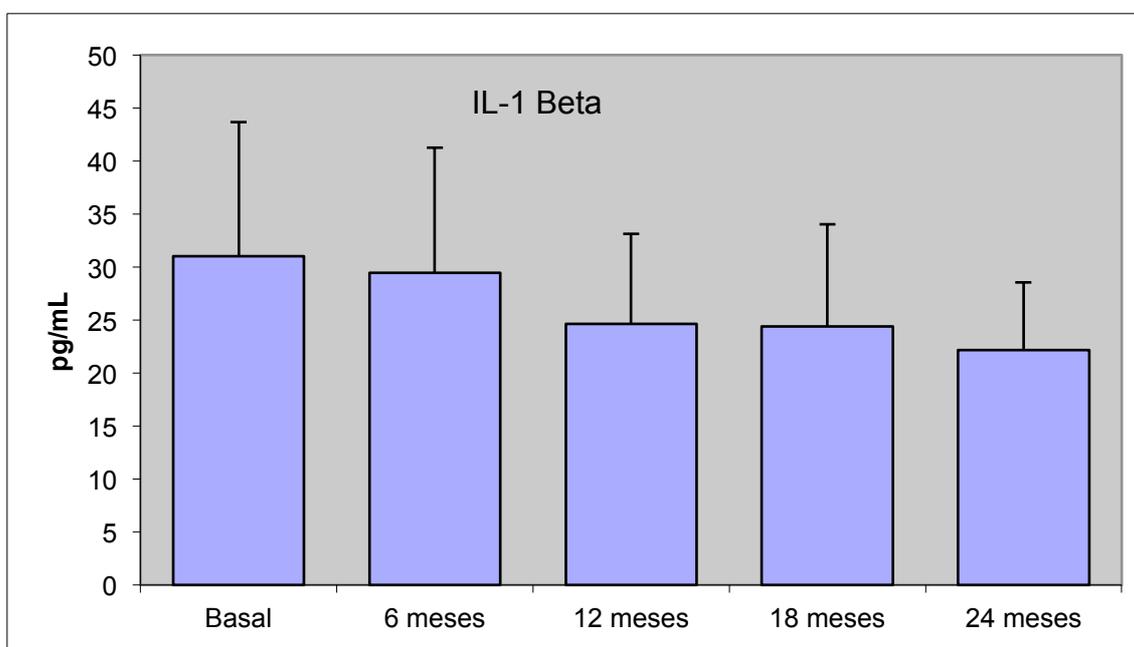


Tabla: Valores medios y desviación estándar de IL-1Beta

4.4.11.- IL-13

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	*ND	6,0	6,0	5,0	8,0
P2	2,0	2,0	4,0	4,0	5,0
P3	11,0	6,0	4,0	9,5	*ND
P4	5,0	6,0	5,5	4,0	4,0
P5	9,0	8,5	4,0	7,0	5,0
P6	16,0	9,0	11,0	12,0	10,0
P7	11,0	10,0	9,0	8,0	8,0
P8	9,0	9,0	9,0	8,0	7,5
P9	4,0	3,0	4,5	3,0	*ND
P10	6,5	8,0	7,0	5,0	7,0
P11	6,0	10,0	8,0	10,5	9,3
P12	4,0	5,0	7,0	4,0	4,0
Media	8,15	6,88	6,58	6,67	6,14
Desv.std	3,82	2,65	2,32	2,94	2,27

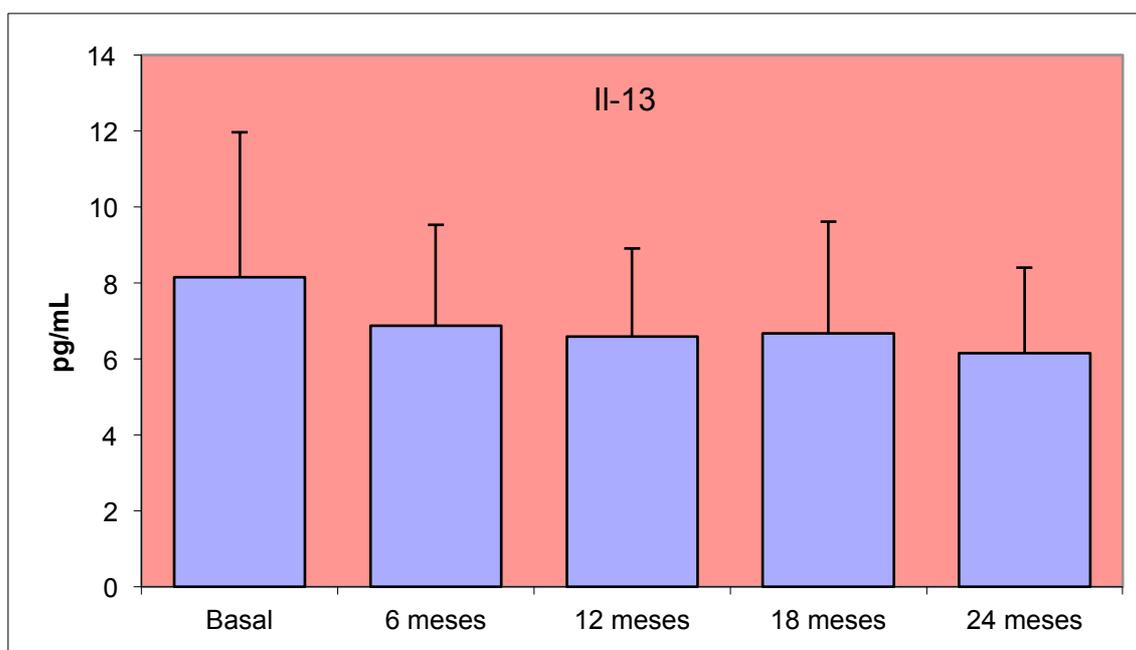


Tabla: Valores medios y desviación estándar de IL-13

4.4.12.- IL-4

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	*ND	15,0	15,0	8,0	8,0
P2	14,0	13,0	13,0	12,0	11,0
P3	34,0	27,0	8,0	20,0	*ND
P4	11,0	17,5	11,5	12,5	16,0
P5	24,0	37,0	14,0	19,5	13,0
P6	55,0	33,0	33,5	27,0	22,0
P7	23,0	31,0	32,0	17,0	21,1
P8	27,0	23,0	20,0	21,5	19,4
P9	7,0	9,0	19,0	6,0	*ND
P10	13,5	23,0	18,0	11,0	15,5
P11	15,0	24,0	15,0	15,0	16,2
P12	13,0	17,0	18,5	13,0	13,0
Media	22,25	22,46	18,13	15,21	14,07
Desv.std	14,18	8,53	7,64	6,03	4,42

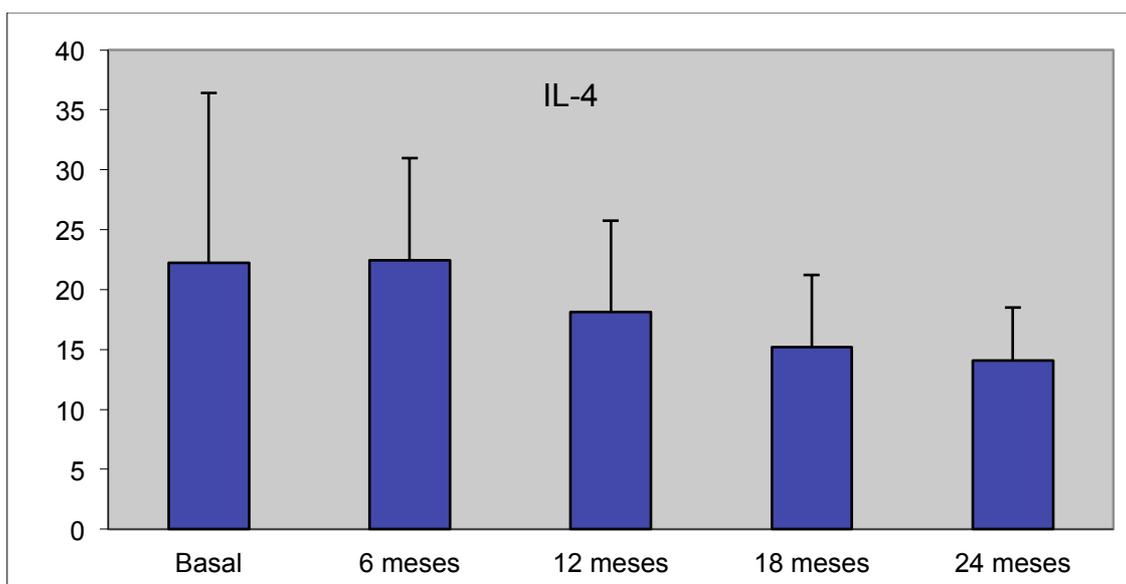


Tabla: Valores medios y desviación estándar de IL-4

4.4.13.- IL-5

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	*ND	12,0	23,0	8,0	8,0
P2	5,0	5,5	4,0	6,0	6,0
P3	31,0	18,5	3,0	24,5	*ND
P4	6,0	9,0	6,0	5,0	6,0
P5	22,5	28,5	9,0	8,0	7,0
P6	14,0	6,5	3,0	2,0	2,0
P7	7,0	21,0	9,5	15,5	9,1
P8	21,5	21,0	16,5	22,5	16,4
P9	3,5	6,0	4,0	2,0	*ND
P10	4,0	7,5	9,0	4,5	8,0
P11	8,5	8,0	7,0	14,5	12,2
P12	9,0	12,5	12,5	6,0	7,0
Media	12,70	13,00	8,88	9,88	6,29
Desv.std	9,30	7,50	6,03	7,63	2,06

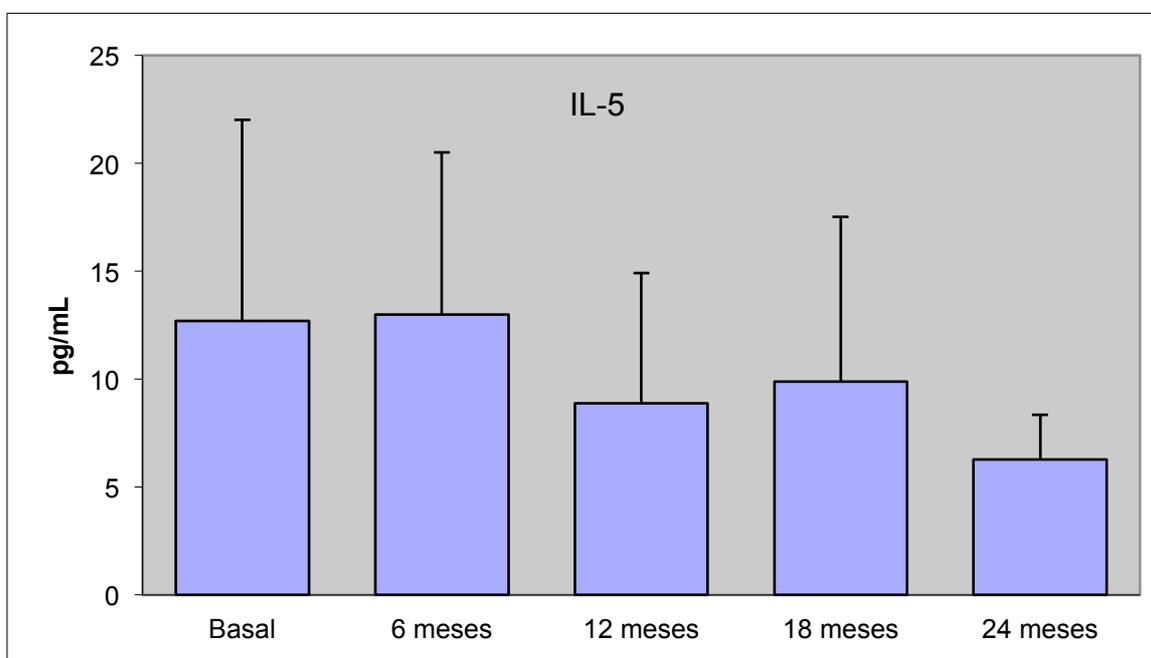


Tabla: Valores medios y desviación estándar de IL-5

4.4.14.- IL-12p70

Paciente	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	*ND	9,0	9,0	6,0	6,0
P2	11,0	11,0	14,0	10,0	10,5
P3	36,5	20,0	8,0	25,5	*ND
P4	9,0	10,0	6,5	6,0	8,0
P5	24,0	30,0	11,0	22,0	11,5
P6	49,0	37,0	33,0	36,0	23,5
P7	15,0	10,0	28,5	10,0	9,2
P8	23,0	13,0	15,0	18,5	13,0
P9	6,5	5,0	8,0	4,0	*ND
P10	9,5	16,0	12,0	6,0	15,0
P11	13,0	14,0	13,0	16,0	13,2
P12	6,0	5,0	8,0	4,0	6,0
Media	19,15	15,00	13,83	13,67	11,50
Desv.std	14,20	9,73	8,39	10,12	6,19

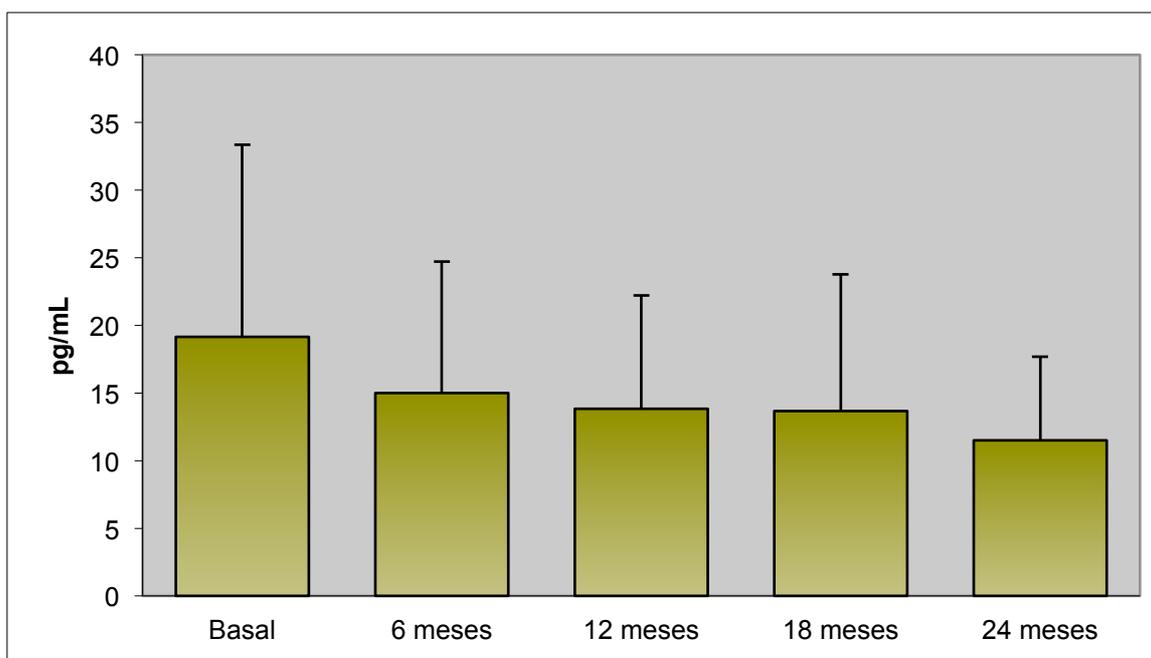


Tabla: Valores medios y desviación estándar de IL-12p70

4.4.15.- IFN-gamma

Pacientes	Basal	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
P1	*ND	13,0	21,0	12,0	13,0
P2	12,3	14,0	18,5	17,0	21,0
P3	39,0	31,0	12,0	26,0	*ND
P4	7,0	15,0	10,0	9,0	13,0
P5	24,0	41,5	13,0	24,0	17,0
P6	67,5	38,0	42,0	36,0	30,0
P7	28,0	26,0	22,0	20,0	20,1
P8	26,0	19,5	19,0	27,0	19,2
P9	7,0	7,0	12,0	8,0	*ND
P10	9,0	19,5	16,0	12,0	21,0
P11	12,0	28,5	19,0	19,5	19,0
P12	8,5	15,0	19,0	12,0	10,5
Media	22,8	22,33	18,62	18,54	17,92
Desv.std	19,17	10,67	8,33	8,51	6,69

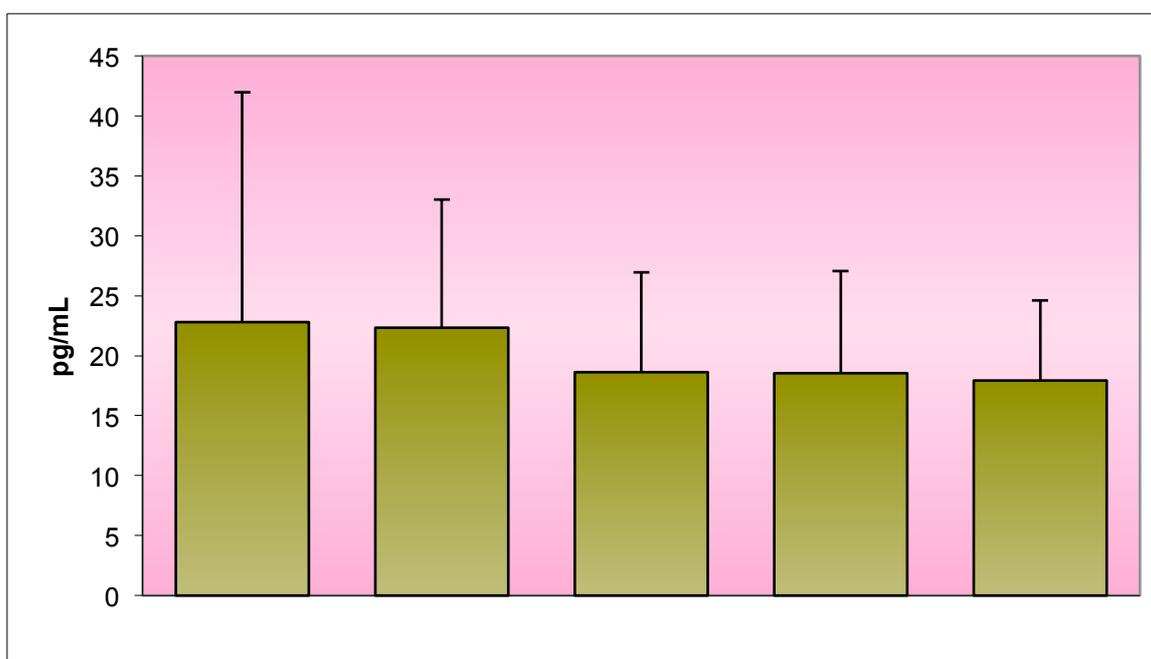


Tabla: Valores medios y desviación estándar de IFN-gamma.

Según los resultados obtenidos en el presente estudio parece no existir diferencia significativa entre algunas de las citoquinas Th2 analizadas entre el grupo activo y el grupo control como:

- IL-4= 22.3 pg/ml en grupo activo y 31.5 pg/ml en el grupo control
- IL-5= 12.7 pg/ml en grupo activo y 15 pg/ml en grupo control
- IL-6= 6.9 pg/ml en grupo activo y 3.0 pg/ml en grupo control
- IL-8= 21.6 pg/ml en grupo activo y 21.1 pg/ml en grupo control
- IL-13= 8.2 pg/ml en grupo activo y 7.0 pg/ml en grupo control

Tampoco se han hallado diferencias significativas en otros grupos de citoquinas:

- IL-2= 20.0 pg/ml en grupo activo group y 17.5 pg/ml en controles
- IL-12p40= 381 pg/ml en grupo activo y 305.5 pg/ml en controles
- IL-12p70= 19.2 pg/ml en grupo activo y 25.0 pg/ml en controles
- IFN- γ = 22.3 pg/ml en grupo activo y 31.5 pg/ml en controles
- TNF- α = 17.8 pg/ml en grupo activo y 14.7 pg/ml en controles
- TGF- β = 3.9 pg/ml en grupo activo y 3.5 pg/ml en controles
- IL-10= 8.7 pg/ml en grupo activo y 9.0 pg/ml en controles
- IL17= 12.5 pg/ml en grupo activo y 13.0 pg/ml en controles.

Durante el seguimiento evolutivo no se han observado diferencias significativas en estas citoquinas entre los valores basales y las determinaciones seriadas posteriores. Sin embargo, durante el primer año de seguimiento se observan algunas diferencias que están próximas a considerarse significativas: IL-5 ($p=0.06$), IL-6 ($p=0.09$), eotaxina ($p=0.07$), IL-12p40 ($p=0.08$) y IL-10 ($p=0.09$).

En las proteínas de macrófagos MIP-1alfa y MCP-1 sí se hallaron diferencias significativas en los valores basales entre el grupo activo y el grupo control ($p < 0,05$). Los niveles de MIP-1alfa fueron de 11,4 pg/ml en el grupo activo frente 26,9 pg/ml en el grupo control.

Los niveles de MCP-1 fueron de 11,9 pg/ml en el grupo activo frente a 28,7 pg/ml en el grupo control ($p < 0,05$). Los valores de estas 2 citoquinas mostraron tendencia al aumento progresivo durante el periodo de seguimiento tras la desensibilización alimentaria, alcanzando a los 2 años valores similares a los del grupo control

Los factores angiogénicos PDGF y VEGF mostraron también basalmente diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0,05$), aunque en esta ocasión con unas cifras que eran superiores, 1170 pg/ml y 253pg/ml respectivamente, a las mostradas por los controles, 501pg/ml y 108 pg/ml respectivamente. Durante el seguimiento posterior de estos pacientes se observó una tendencia al descenso que fue significativo a los 6 meses y a los 12 meses ($p < 0,05$) aproximándose a los valores del grupo control.

4.5.- QUINTA FASE DEL ESTUDIO:

Búsqueda de posibles biomarcadores diferenciadores y útiles en el diagnóstico diferencial con otras enfermedades inmunológicas inducidas por alimento.

4.5.1.- Muestra: se seleccionan 3 grupos muestrales

- **Grupo1 (n=19):** Pacientes diagnosticados de celiaquía, con clínica sugerente y confirmado por Ig anti-transglutaminasa e IgA antigliadina positivos, y marcadores genéticos compatibles.

-**Grupo 2 (n=18):** Pacientes diagnosticados de alergia alimentaria a proteínas de leche de vaca mediante los criterios clínicos y serológicos , según protocolo -ver Métodos-.

-**Grupo 3 (n=10):** Como grupo control (sano) se seleccionaron 10 pacientes, se descartó enfermedad celiaca y alergia alimentaria. Acudían a la consulta de Alergia por posible alergia a medicamentos.

Paciente	EDAD	SEXO	TG	GLIADINA	SINTOMA INICIAL
1	43	M	126	47,56	dispepsia+dismotilidad
2	5	V	>128	<15	anemia ferropénica
3	42	V	>128	<15	diarrea+dolor abdominal
4	6	M	36	194,8	distensión abdominal
5	9	V	>128	173,9	anemia ferropénica
6	12	M	>128	100,9	molestias abdominales
7	10	V	>128	38,28	distensión abdominal
8	6	V	>128	>200	diarreas+falta medro
9	7	M	60	>200	distensión abdominal
10	11	V	>128	>200	estreñimiento+dolor abdominal
11	7	V	>128	119	diarrea+dolor abdominal
12	15	V	>128	139,5	distensión abdominal
13	5	M	>128	135,7	diarreas+falta medro
14	48	V	>128	138,4	Molestias abdominales
15	5	V	>128	>200	diarreas+falta medro
16	14	V	80	135	diarrea+dolor abdominal
17	8	V	>128	137	diarrea+dolor abdominal
18	23	M	>128	>200	Anemia ferropénica
19	4	V	>128	>200	diarreas+falta medro

Tabla: Características de la muestra del grupo 1 (V:varón; M:mujer)

4.5.2.- Resultados de citoquinas:

Se realizó la determinación sérica con las mismas citoquinas del ensayo anterior en diferentes grupos, comparando a los pacientes alérgicos a alimentos como la leche de vaca, en el momento basal antes del tratamiento desensibilizante, en otro grupo de pacientes que presentan una enfermedad inflamatoria intestinal de origen inmunológico también desencadenada por la exposición con un alimento, como la celiaquía, y con la cual en muchas ocasiones es obligatorio realizar diagnóstico diferencial.

Las citoquinas analizadas están incluidas en el Kit comercial Procarta® Cytokine Assay -Ver Métodos-.

Grupos de Pacientes	n	IP-10	IL-8	IL-17	IL1Alfa	Eotaxina	IL-12 p40
Celíacos	19	212	20,8	36,9	22,3	262,1	73
Alérgicos a Alimentos	18	627	21,6	12,5	59,9	361,3	381
Controles	10	111	13,4	6,1	24,4	68	214,6

Tabla: Resultados obtenidos en los 3 grupos de pacientes (Fase 5)

Los resultados mostraron un aumento significativo de la citoquina IP-10 en los pacientes diagnosticados de Enfermedad Celíaca comparados con los pacientes del grupo control que no tenían enfermedad celíaca ni alergia alimentaria. Sin embargo, en los pacientes con alergia alimentaria se observa presentan unos valores aún más elevados que los celíacos, como se observa en la tabla adjunta, siendo significativa esta diferencia ($p < 0,05$).

Igualmente se encontró que en ambos grupos de pacientes, celíacos y alérgicos a alimentos, existían unos niveles aumentados de tanto la eotaxina, como la IL-8 y la IL-17 en comparación con los del grupo control. Aunque la diferencia puede parecer marcada, la desviación estándar tan amplia hizo que ésta no llegara a alcanzar niveles significativos.

En el caso de la citosina IL-1Alfa sólo se apreciaron valores superiores en el grupo de pacientes alérgicos a alimentos en comparación tanto con los celíacos como el grupo control, aunque sin alcanzar la significación estadística. También cabe destacar la IL-12p40, la cual muestra unas cifras destacadamente más bajas en celíacos comparativamente al grupo control y también con el grupo de pacientes alérgicos a alimentos.

El resto de citoquinas analizadas en este ensayo con los 3 grupos de pacientes no mostraron resultados destacables, con pequeñas variaciones que no llegaba a ser significativas. En algunos casos los valores obtenidos eran tan bajos que posiblemente haya que considerar en futuros estudios intentar su medición mediante otras técnicas más apropiadas.

5.- DISCUSION

El notable incremento que ha experimentado la alergia alimentaria en las últimas décadas⁸⁻¹⁰ y su repercusión global ha ocasionado no sólo un mayor interés público general y de las organizaciones sanitarias, que ven cada vez más cercana la problemática que ocasiona, sino también de la propia comunidad científica que ha dirigido sus esfuerzos para mejorar el conocimiento de las bases inmunológicas que originan y sustentan esta enfermedad,⁶ así como en la optimización de los métodos diagnósticos y el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas.

Aunque se estima que la prevalencia de la alergia a alimentos afecta al 2-4% de la población general, se acepta que ésta es más frecuente en la población infantil, pudiendo llegar al 8-10% según el tramo de edad estudiado y resultando generalmente superior en los primeros años de vida^{2,10} Pero es quizás la velocidad a la que se está produciendo el incremento en la prevalencia de la alergia a los alimentos lo que más alarma ha originado, pues se calcula que en los últimos 20 años la población alérgica se ha duplicado, y que además dicha tendencia persistirá en los próximos años, según revelan los últimos estudios epidemiológicos.^{5,10}

La alergia a alimentos en los niños se considera que tiene mejor pronóstico que en edad adulta ya que en un porcentaje importante de los casos puede ser reversible y desaparecer espontáneamente sin requerir ninguna intervención terapéutica.^{3,7} Esto ocurre sobretodo en algunos alimentos, como la leche y el huevo, que presentan un aparente buen pronóstico evolutivo siempre que se realice un diagnóstico precoz y una dieta adecuada.^{3,35} Se acepta que siguiendo una dieta restrictiva del alimento responsable, se alcanza la tolerancia de forma espontánea en un tiempo que aunque suele oscilar, puede llegar a casi el 80% de los pacientes a los 4 años de edad.^{4-7,53-57}

Sin embargo, hay que considerar que en aquellos pacientes que no superan la alergia a los alimentos a la edad de 4 años la mayoría de los expertos coinciden al afirmar que su pronóstico empeora,⁵³⁻⁵⁷ pues resulta

menos probable que la sensibilización alimentaria mejore de forma espontánea, de modo que a partir de los 8 años de edad, dicha probabilidad quedaría reducida a menos de un 5%.^{7,39} Estos pacientes son diagnosticados de *alergia alimentaria persistente* y hasta hace relativamente poco tiempo carecían de alternativas terapéuticas válidas y eficaces.⁵⁸⁻⁵⁹

La labor del médico responsable en este caso se limitaba a informar de las pautas y proponer una dieta de evitación alimentaria adecuada para evitar las reacciones adversas que pueden presentarse en estos pacientes ante un eventual contacto accidental con el alimento implicado. Debido a que la gravedad de las manifestaciones clínicas puede ser importante, a este grupo de pacientes se les recomienda que siempre lleven consigo el tratamiento de urgencia de referencia –*autoinyector de adrenalina*– a fin de ser administrado de inmediato ante la presencia de los primeros síntomas de reacción alérgica grave a alimentos.^{53,57,60}

El presente estudio se ha centrado exclusivamente en pacientes con un perfil clínico de alergia a leche de vaca persistente, en los que la expectativa de mejoría espontánea de su sensibilización alimentaria era escasa o nula. Se considera que la selección de un grupo homogéneo de pacientes donde todos presentan formas clínicas graves o anafilaxia permitiría la identificación de alguna posible característica diferencial respecto a aquellos pacientes que presentan formas de sensibilización más leves, con mejor pronóstico y mayores posibilidades de resolución espontánea. De igual modo, nos permitiría valorar de una forma más adecuada el comportamiento clínico e inmunológico de su alergia tras iniciar la terapia de desensibilización alimentaria, así como evaluar si es posible o no modificar la sensibilización alérgica de forma definitiva.

Las manifestaciones clínicas que pueden presentar los pacientes con alergia alimentaria a proteínas de leche de vaca –*ver Introducción*– varían desde las formas más leves como urticaria local, edema mucosos oral o dermatitis de contacto, hasta las formas más graves como urticaria difusa con angioedema generalizado o anafilaxia, como está descrito en los diferentes consensos científicos^{2-4,36-37}. La frecuencia relativa de cada tipo de

manifestación es variable y difícil de determinar debido al amplio rango de cuadros clínicos que pueden presentarse en cada paciente y para cada alimento en particular. El preocupante incremento de las formas clínicas más graves o anafilaxia en este grupo de pacientes en los últimos años, así como la existencia de casos fatales registrados en diferentes países,⁸⁻⁹ ha llevado a impulsar el desarrollo de estudios que buscan nuevas alternativas terapéuticas que ofrecer a este tipo de pacientes.⁸⁻¹⁰

Las diferentes líneas de investigación que están en marcha en la actualidad sobre desensibilización alimentaria e inmunoterapia con alimentos - ver Introducción- ofrecen resultados esperanzadores⁶⁶⁻⁷⁴ que animan a continuar profundizando mediante la investigación clínica y experimental, los mecanismos inmunológicos implicados, así como la búsqueda de las herramientas necesarias para modular la respuesta inmune del paciente hacia la tolerancia del alimento. Para ello es fundamental la coordinación de las diferentes líneas de investigación que permitan mejorar las herramientas diagnósticas disponibles y los protocolos utilizados para optimizar sus beneficios terapéuticos.

5.1.- PRIMERA FASE:

La desensibilización alimentaria con leche es un método válido como procedimiento terapéutico en pacientes con alergia grave a proteínas de leche.

A) Características de la muestra

Durante el diseño del estudio se decidió seleccionar como muestra de pacientes a aquellos que presentaban factores de mal pronóstico -*ver Material y Métodos*- como son la presencia de reacciones clínicas graves o la persistencia de sensibilización inmunológica a proteínas de leche de vaca a partir de los 3-4 años,^{39,53} especialmente si va dirigida hacia la caseína, ya que en estos casos las posibilidades de resolución espontánea son menores.⁵⁴⁻⁵⁷ Se consideró que seleccionar el grupo de pacientes con alergia a proteínas de leche de vaca con manifestaciones clínicas más graves -*anafilaxia*- nos permitiría identificar de forma más clara las posibles características diferenciadoras respecto a aquellos otros individuos que presentan formas sintomáticas más leves.

Es conocido que los niveles de IgE específica frente a leche de vaca o frente a las proteínas de leche de vaca no se correlacionan directamente con la gravedad de la enfermedad,^{39,53} aunque la presencia de concentraciones séricas elevadas de IgE específica frente a leche o frente a las proteínas lácteas se han relacionado con una baja probabilidad de resolución espontánea de alergia a dicho alimento.⁶⁷⁻⁷⁰ En nuestra muestra de pacientes no sólo se considera a los pacientes como graves por la clínica referida, sino que el grado de sensibilización a proteínas de leche tiene unos niveles marcadamente elevados, con una media de IgE específica sérica basal superior a 100kU/l.

Debido a que el tamaño muestral del presente estudio incluía inicialmente sólo 10 pacientes, algunos de los datos clínicos obtenidos de pacientes como la distribución por sexos -con un 90% niños- y la edad -con un amplio rango, de 2 a 15 años- no resultan extrapolables a muestras poblacionales más amplias. Si bien la selección de los niños se hizo de forma

sistemática a partir de la base de datos con todos los pacientes que cumplieran los criterios de inclusión, llama la atención que la gran mayoría de los casos fueran niños.

Aunque no existen datos en la literatura científica que permitan asociar el sexo del paciente a un mayor riesgo de para presentar alergia alimentaria persistente⁶⁹⁻⁷² es de destacar que en algunas series publicadas muestran igualmente un predominio del sexo masculino,^{68,73} dato que indicaría el posible predominio de las formas clínicas de alergia a leche persistente en varones. Por el contrario, diversos autores describen el predominio femenino en la alergia a proteínas de leche de vaca en el momento del debut, al comienzo de sus síntomas.^{7,22}

Resulta difícil establecer conclusiones a partir del rango de edad de la muestra actual de pacientes, dado que fueron incluidos con edades muy variables. Debido a que existían casos que estaban en seguimiento desde hacía varios años en la Unidad de Alergología fueron incluidos desde el inicio del proceso. Este motivo justifica que en el momento de su inclusión en el protocolo de desensibilización a proteínas de leche de vaca, las edades de los pacientes abarcaran edades tan diversas, con pacientes en los que recientemente se había confirmado el mal pronóstico con 3-4 años de edad, hasta púberes que llevaban varios años de seguimiento, con tiempos de evolución variables.

Una vez que este tipo de protocolos estén bien implementados sería deseable que su inclusión no se demorara tanto en el tiempo, una vez que el perfil clínico grave persistente haya sido bien establecido, para minimizar el riesgo de reacciones alérgicas accidentales potencialmente graves.⁶⁰ Valorando los antecedentes personales de los pacientes seleccionados de la muestra del presente estudio, se puede considerar como una población sana en general, sin patologías de base destacables, al no asociar ninguna “enfermedad no alérgica” conocida, de forma similar a lo descrito en series anteriores.⁶⁵⁻⁷⁴

Resulta destacable que todos los pacientes presentaban antecedentes personales de *alergia respiratoria* en el momento de la inclusión en el procedimiento de desensibilización alimentaria, aunque en la mayoría de los casos se trataba de rinitis y/o asma de tipo episódica o leve persistente -según los criterios de las guías ARIA y GINA-.¹¹⁶⁻¹¹⁷ Sólo 2 de los pacientes seleccionados presentaban rinitis moderada persistente y 1 paciente asma moderado persistente, precisando para el control de su enfermedad respiratoria tratamiento farmacológico de mantenimiento a diario. En el momento de su inclusión en el protocolo de desensibilización alimentaria todos los pacientes se encontraban bien controlados y no habían presentado exacerbaciones recientes en los últimos 3 meses.

Otra característica destacable del grupo de pacientes incluidos en el presente estudio es la alta tasa de *polisensibilización alimentaria* o alergia simultánea a múltiples alimentos, ya referido en otras series.⁶⁸⁻⁷³ En nuestra serie la mitad de los pacientes tenían al menos alergia a otro tipo de alimento además de leche de vaca, y un tercio se encontraban polisensibilizados a varios alimentos, lo cual añadía una mayor dificultad a la hora de seguir una dieta adecuada y segura a diario.

También es destacable que casi un tercio de los pacientes seleccionados asociaban dermatitis atópica -2 *leves* y 1 *moderada*- entre sus comorbilidades, siendo todos menores de 8 años, sin apreciarse cambios destacables en su evolución natural durante el transcurso del procedimiento de desensibilización alimentaria, siguiendo el mismo curso clínico que previamente había tenido. Si bien en algunas series el eczema atópico se considera una contraindicación o limitación para incluir al paciente en el procedimiento de desensibilización, algunos autores con Staden⁶⁸ incluyeron también pacientes con dermatitis atópica moderada, hallando igualmente que la evolución de la dermatitis no se vió aparentemente influenciada ni tampoco se observó que la inmunoterapia presentara una evolución diferente con respecto al resto de pacientes que no presentaban esta condición cutánea.

La alta tasa de coexistencia con otras enfermedades alérgicas, ya sean de tipo respiratorio que aparece en el 100% de los casos, o patología cutánea como la dermatitis atópica en un tercio de los pacientes, e incluso otras alergias alimentarias detectada en la mitad de la muestra, podría estar relacionado con un grado de atopia elevado vinculado a la herencia genética del paciente.^{7,22} En algunos casos ha querido relacionarse esta coexistencia de otras enfermedades alérgicas con un mayor riesgo de alergia alimentaria persistente o de mal pronóstico,⁵²⁻⁵⁷ aunque los resultados no se consideraron definitivos.

Todos los pacientes seleccionados en el presente estudio tenían reflejado en sus antecedentes personales episodios previos de *reacciones graves* tras contacto accidental con leche de anafilaxia grado II-III, por lo que precisaban llevar medicación de rescate de emergencia de forma permanente durante su vida cotidiana -Ver muestra en Material-. En algunos casos –un 30% de pacientes- habían presentado las manifestaciones clínicas por vías de contacto diferentes a la vía oral como sería la inhalación o por contacto mucoso-cutáneo, es decir, sin llegar a ingerir el alimento, lo cual apunta hacia el *alto grado de sensibilización* que mostraba este grupo de pacientes.

A pesar de seguir una dieta restrictiva sin leche ni derivados lácteos de forma estricta, todos tenían antecedentes de haber precisado asistencia urgente en un centro sanitario por estos contactos inadvertidos en al menos 1 ocasión en el último año, llegando a precisar ingreso hospitalario en 3 de los pacientes, siendo 1 de ellos en la unidad de cuidados intensivos pediátricos. Todo ello conlleva además periodos posteriores de recuperación en domicilio, lo cual supone faltas de asistencia escolares y días de permiso o baja de alguno de sus padres, según ya se ha referido.^{22,60} Estos datos justifican el marcado impacto que ocasionaba en la calidad de vida de estos pacientes y sus familias, como ya han apuntado estudios previos.^{52,60}

B) Resultados del procedimiento de Desensibilización alimentaria

A pesar del perfil clínico grave descrito en los pacientes de esta muestra, hay que destacar que en todos los casos se logró completar el protocolo en el tiempo estimado, tanto en la primera fase o *rush* en la unidad de cuidados intensivos durante sólo 2 días, como en la fase de ascenso de dosis ambulatoria en consulta de 6-7 semanas, con manifestaciones clínicas adversas de grado leve en su mayoría y en todos los casos controlables, de forma similar a lo descrito en series anteriores por otros autores.⁶⁶⁻⁷⁴

Esto debe ser considerado en el contexto de sus condiciones de vida habituales, ya que si comparamos las reacciones presentadas durante el procedimiento con las que habitualmente presentaban en su vida cotidiana ante contactos inadvertidos, en ningún caso éstas superaron en gravedad a las reflejadas en sus antecedentes personales de episodios adversos previos. Aunque los pacientes efectivamente presentaron diversos episodios de reacciones adversas en el transcurso del procedimiento, en ningún caso precisaron ingreso hospitalario posterior o permanencia prolongada en la unidad donde se realizaba el protocolo, siendo dados de alta en todos los casos al final de la jornada de mañana.

En todos los casos, tal y como se expuso en el protocolo -Ver Métodos- al completar el proceso de desensibilización inicial se les indicaba la dosis de leche que debían tomar diariamente en su domicilio como mantenimiento y se les autorizaba determinados cambios en la dieta, permitiéndose la toma de derivados lácteos así como alimentos que contienen leche en su composición. De esta forma se lograba una normalización en su dieta y por tanto de su vida cotidiana, o al menos parcial en aquellos pacientes polisensibilizados a otros alimentos, lo cual ya es considerado por algunos autores uno de los mayores éxitos de la inmunoterapia oral alimentaria por sí solo.^{68,70,72}

La tasa de éxito de este tipo tratamiento, entendido como la finalización del procedimiento con buena tolerancia clínica al alimento, aunque variable

según los grupos, se considera que es para la leche del 75-86%,⁶⁶⁻⁷² aunque menor si se entiende sólo como éxito la tolerancia a dosis completa de 200 ml de leche, pues se considera que entre un 15 y un 30% de los casos inicialmente sólo alcanzan la tolerancia de forma parcial, a una dosis menor de la esperada.

Sin embargo, para otros alimentos la tasa de éxito alcanzada parece menor como en el caso del huevo^{75,76,118} o los frutos secos,^{77,78,101} alcanzando cifras entre el 60 y el 70% de éxito. Esta variabilidad se ha querido justificar por la falta de homología entre los diferentes estudios a la hora de seleccionar la muestra, la gran variabilidad clínica que presentan los pacientes incluidos en cada estudio o posibles diferencias por características intrínsecas a cada alimento, que hace que los resultados sean difícilmente comparables de forma completa.

En nuestro caso¹⁷³⁻⁵ la tasa de éxito lograda es del 100% y creemos que puede estar justificado por diversos motivos:

- el alto grado de seguimiento clínico que se les proporciona.
- asesoramiento personalizado al paciente y su familia.
- facilidad de acceso al médico responsable (en consulta o telefónico).
- sensación de mejora de calidad de vida (acceso a dieta libre)
- resultados clínicos visibles en relativamente poco tiempo.

Esto explicaría cómo a pesar de presentar reacciones adversas durante el procedimiento la tasa de abandono ha sido del 0%, y el grado de cumplimiento y adherencia ha sido muy alto durante todo el seguimiento. El hecho de disminuir rápidamente la gravedad de las reacciones adversas presentadas por los pacientes en comparación con las previas al tratamiento, y el descenso progresivo de su incidencia, podría justificar el alto grado de adherencia durante todo el tiempo de seguimiento del presente estudio.

De todos modos, aunque algunos autores consideran como éxito sólo si se logra alcanzar el objetivo de la tolerancia completa del alimento, unos 200cc de leche o un huevo completo, también se puede considerar beneficioso la

tolerancia parcial, ya que en estos pacientes el protocolo realizado disminuye el riesgo de reacciones graves con ingestas inadvertidas o contactos accidentales con pequeñas cantidades del alimento.^{68,72}

En algunos estudios se ha estimado que en pacientes graves la tolerancia total sólo se alcanza en menos de la mitad de los pacientes,⁶⁸ pero si se consideran tanto a los pacientes con tolerancia completa, los 200 ml en el caso de la leche, como a los que alcanzan al menos la tolerancia parcial, el éxito de la desensibilización alcanza a más del 80% de los pacientes.⁶⁷

Actualmente no hay estudios que claramente expongan unos límites de detección de IgE específica a leche óptimos por debajo de los cuales se obtenga un rendimiento eficiente para la desensibilización con leche. En pacientes con anafilaxia se han postulado varias cifras, tales como IgE específica superior 70 kU/L¹¹⁹ o a 85 kU/L.¹²⁰

En otros estudios con pacientes con alergia a leche se han postulado diferentes valores de IgE específica pero la media aritmética de los valores iniciales de los grupos de pacientes en los grupos activos diferían mucho: 71 kU/L,⁷⁰ 27 kU/L,⁷⁴ 31 kU/L⁷² ó 2 kU/L.¹¹⁸ Una vez más la falta de homología entre las muestras estudiadas en cada serie dificulta la posible comparación de los resultados obtenidos que nos permitiría alcanzar conclusiones definitivas.

Algunos autores opinan^{121,122} que los niveles basales elevados de IgE específica frente leche previos a la desensibilización alimentaria tienen un valor pronóstico y pueden predecir el fracaso para obtener una desensibilización completa. Sin embargo, no se determina un punto de corte preciso de dichos niveles mediante el cual se pueda prever la evolución.

En nuestra serie no hemos podido establecer ese punto de corte por las limitaciones técnicas descritas a la hora de determinar las cifras totales de IgE específica a leche -ver métodos y resultados- pero nos parece significativo que la tasa de éxito obtenida sea del 100% cuando la mayoría de los pacientes

presentan niveles tan elevados de sensibilización: 50% pacientes con más de 100 kU/l y 30% pacientes con más de 40kU/l.

Desde el comienzo del presente estudio se han comunicado en diversas publicaciones los resultados obtenidos en cada etapa. Los primeros resultados comunicados por nuestro grupo de trabajo fueron el éxito obtenido en la aplicación del presente protocolo de desensibilización a leche en pacientes con anafilaxia por proteínas de leche, inicialmente con una serie de 6 pacientes -ver comunicación a SEAIC 2008 en Anexo 4- que posteriormente fue ampliada¹⁷³⁻¹⁷⁶ confirmando los mismos resultados satisfactorios.

Estos datos aportaron una información valiosa en aquel momento, pues aún entonces se consideraba la anafilaxia por leche de vaca un criterio de exclusión en la mayoría de los protocolos por el alto riesgo que se suponía que conllevaba para estos pacientes.

El éxito referido por nuestra serie¹⁷³⁻⁶ así como por otras posteriores,^{120,123} con una tasa de reacciones adversas similares a las descritas en otras series publicadas, ha conllevado que en los años siguientes este tipo de pacientes graves no quedaran excluidos por otros autores.¹²⁴ Sin embargo, su inclusión en el procedimiento no significa que no deba considerarse esta condición de gravedad y alto grado de sensibilización durante el seguimiento, ya que podría condicionar su evolución a largo plazo.¹²⁰

5.2.- SEGUNDA FASE:

Evaluación los diferentes patrones de respuesta inmunológica durante el procedimiento de desensibilización alimentaria con leche.

A) Evolución de la IgE específica a leche y sus proteínas

Existen publicados diversos estudios realizados con series de pacientes con alergia a leche de vaca en los que se ha realizado un proceso de desensibilización alimentaria y en los se ha realizado seguimiento clínico valorando además repuesta de la sensibilización inmunológica. Para ello se han valorado diferentes posibles marcadores de evolución o eficacia utilizando inicialmente los disponibles en la práctica clínica habitual de una consulta de Alergología. La forma más habitual y accesible de valorar la sensibilización inmunológica a leche de vaca es a través de la determinación de los niveles de IgE específicas frente a leche y las proteínas de la leche: alfa-lactoalbúmina, Beta-lactoglobulina y caseína.^{33,34}

Durante el seguimiento de estos pacientes ha existido desde el principio controversia con los resultados obtenidos,⁶¹⁻⁶⁴ pues si bien tras la desensibilización alimentaria algunas de estas series de pacientes muestran una tendencia al descenso de los niveles de IgE específica, con unas cifras posteriores significativamente inferiores a los valores basales,^{67-70,73,118} en otros casos no se hallaron cambios significativos o con tendencia incluso a aumentar sus niveles de sensibilización inmunológica basales.^{72,82,101}

En los poco ensayos clínicos en los que se realizó seguimiento no hay unanimidad en las conclusiones. En el estudio realizado por Skripak.⁷⁰ se informó de un cambio en la mediana de la IgE específica a leche en los pacientes del grupo activo de un 8% mientras que en el grupo placebo fue de un 5%. Esta diferencia de medianas no fue estadísticamente significativa y tampoco lo fue la diferencia de las medias aritméticas. De un modo similar, Pajno⁷² no encontraron diferencias estadísticamente significativas con una

disminución de la IgE específica en el grupo activo de un 13% mientras en el grupo placebo también hubo una disminución del 7%.

En la serie publicada por Longo¹²⁰ había pacientes con niveles de IgE específica mayores de 100 kU/l y hubo ocho pacientes con descensos de al menos 50 kU/l principalmente en pacientes del grupo activo después de la desensibilización. En el estudio de Martorell⁷⁴ sí se determinó a los 12 meses un descenso estadísticamente significativo de un 60% en los niveles de IgE específica a leche completa en el grupo tras ITO frente a un descenso de tan solo un 9% en el grupo placebo. Finalmente, el estudio de Salmiviesi¹¹⁹ obtuvo una reducción pero sin diferencias significativas en ambos grupos.

Sin embargo, si analizamos estas series vemos como estos resultados no significativos provenían de determinaciones séricas realizadas en estadios muy precoces en los primeros meses tras el procedimiento, lo cual puede significar que un periodo de observación tan escaso no permitiera ver la evolución del nivel de sensibilización alérgica.

Estas diferencias entre los diferentes grupos podrían estar justificadas por la variabilidad entre los protocolos empleados y la falta de homología en los criterios clínicos de inclusión empleados en cada caso, como el tipo de clínica de alergia alimentaria o gravedad, lo cual implica variabilidad en la población estudiada, y por tanto dificultades para extrapolar los resultados. Es destacable como en los estudios en los que no encuentran variación evolutiva en los niveles de IgE específica, son determinaciones realizadas en la fase aún de inducción de tolerancia inicial en los primeros meses, es decir, tras acabar la primera fase de la desensibilización en la que se incrementaban progresivamente las dosis a los pacientes.¹⁰¹ Sin embargo, posteriormente cuando se ha analizado la evolución de la IgE específica a leche a más largo plazo, en diversas series de pacientes sí se ha observado generalmente la evolución al descenso de estos anticuerpos y por tanto del nivel de sensibilización alérgica.⁶⁸⁻⁷⁴

En la muestra de pacientes del presente estudio la respuesta inmunológica de la IgE específica a leche y sus proteínas ha sido en forma de descenso progresivo de los niveles de sensibilización respecto a los valores basales -ver Resultados-. Sin embargo, la intensidad de este descenso y el momento en que éste se hace evidente es de una gran variabilidad. Se ha podido comprobar como en algunos casos a pesar de presentar niveles de IgE específica iniciales muy elevados, desde la primera revisión evolutiva a los 6 meses sus cifras se veían reducidas en más de la mitad, mientras que en otros casos la respuesta era más progresiva y tardía, independientemente de las cifras basales presentadas -Ver gráficas en Resultados-. Esta variabilidad en la respuesta ha sido corroborada por otros autores, llegando incluso a proponer una clasificación según el grado de respuesta.⁶⁸

Debemos tener en cuenta que existía una limitación técnica al no poderse medir en nuestro centro las cifras de IgE específica superiores a 100 kU/l, por lo que desconocemos la cifra exacta desde la que partían estos pacientes altamente sensibilizados, e inicialmente desconocemos el grado de respuesta que mostraban éstos, ya que no se podían medir con exactitud hasta que los niveles eran inferiores a 100 kU/l.

Actualmente la mayor parte de las series han constatado que los niveles de IgE específica a leche en general tienden a descender con el tiempo. Pero el hecho de que la respuesta sea variable y que en muchos casos la IgE específica sérica a leche no desaparece por completo, puede crearnos dificultades en el seguimiento a la hora de valorar cuándo un paciente está aún en fase de mejoría progresiva de su grado de sensibilización alérgica, o ya ha alcanzado su mejoría inmunológica máxima,¹²⁵ o existe una falta de respuesta inmunológica por descenso de la IgE específica, y por tanto el fracaso de la inmunoterapia.⁶⁸

En nuestra serie, si bien el descenso más significativo se observa en el primer año, éste continua en los siguientes años aunque a una velocidad cada vez menor.¹⁷³⁻¹⁷⁵ Podemos ver cómo en algunos casos se observa descenso en las cifras de IgE específica a leche incluso al final del periodo de

observación, en el 4º y 5º años de seguimiento, por lo que nos resulta difícil estimar qué duración total debe contemplar este tipo de tratamientos desensibilizantes para alergia alimentaria -Ver tablas y gráficos de Resultados-. Este sería uno de los puntos más debatidos en la inmunoterapia oral alimentaria en la actualidad, el poder definir cuando un paciente ha completado la desensibilización y no precisa seguir ninguna pauta estricta de dosis de alimento diario sin riesgo de volver a presentar reacciones adversas tras contacto con el alimento.^{68,83}

La existencia de casos descritos en la literatura científica de reaparición de la clínica de alergia alimentaria en pacientes que suspendieron la administración de su dosis diaria de alimento durante 2 semanas tras realizar la desensibilización,⁸³ hacen pensar que en cada caso haya que valorar el nivel de tolerancia adquirido antes de interrumpir el tratamiento. Esto ha llevado a algunos autores de casos a estudiar cómo se comportan estos pacientes a largo plazo,⁶⁸ sometiendo a una dieta de evitación prolongada para dicho alimento a los pacientes durante 2 meses y valorar cómo se comportan posteriormente ante una provocación oral con dicho alimento. Se pretende valorar de este modo el grado de mejoría real de la sensibilización alérgica y si la tolerancia obtenida es persistente o transitoria, para conocer si la no reactividad clínica sigue dependiendo aún del mantenimiento del contacto diario con la dosis del alimento o no.

Según Staden,⁶⁸ en su serie de pacientes el 36% mostraron buena tolerancia en la provocación tras la dieta restrictiva del alimento, por lo que podían clasificarse como *respondedores completos o definitivos*. En el 12% de los pacientes la tolerancia clínica mostrada seguía dependiendo del mantenimiento de la dosis diaria, y tras un periodo de evitación volvían a manifestar síntomas al reintroducirlo, por lo que serían *respondedores transitorios*, y el 16% sólo lograron tolerancia parcial al alimento por lo que serían *respondedores parciales*.

En nuestra serie, considerando los altos niveles de sensibilización mostrados inicialmente por los pacientes, de momento no se ha realizado

ninguna prueba de re-exposición tras dieta restrictiva para valorar el grado de persistencia de la tolerancia alcanzada, pero sí que se ha registrado en algunos pacientes periodos de 2 ó 3 días sin toma de la dosis diaria de leche debido a situaciones especiales, como por ejemplo fracturas accidentales, cirugías no programadas, gastroenteritis grave, etc, las cuales suponían periodos en los que el mantenimiento de la dosis se veía imposibilitado. En estos pacientes se ha podido reintroducir el alimento sin reacciones significativas, aunque empíricamente se les reducía la dosis un 20% con respecto a la dosis máxima que toleraban hasta entonces.

Un aspecto poco desarrollado en estas series de pacientes de desensibilización a leche, es la determinación de IgE específica frente a las proteínas individuales contenidas en la leche de vaca, tales como caseína, α -lacto-albúmina, β -lacto-globulina, y otras como lacto-ferrina o seroalbúmina bovina. En cuanto a la determinación de IgE específica frente a la leche completa en comparación con la de IgE frente a proteínas individuales, no existe tampoco un perfil claro de qué proteína sería la predominante en la respuesta mediada por IgE en los diferentes fenotipos de alergia a leche. Generalmente, en el fenotipo sistémico que asocia clínica cutánea, respiratoria y cardiovascular por ingestión de leche y mediada por IgE, se considera a la IgE específica frente a la caseína como un marcador válido.^{52,53}

Esta asociación entre fenotipo clínico de alergia a leche de vaca y perfil de sensibilización parece poder extenderse a otro tipo de cuadros clínicos y no sólo a la anafilaxia, según apuntan algunos estudios que analizan las características clínicas de aquellos pacientes alérgicos a leche que sólo manifiestan clínica digestiva, como dolor abdominal, alteración de ritmo intestinal, meteorismo, etc.¹⁷⁷ En estos pacientes, una vez descartada la intolerancia a la lactosa se ha emitido el diagnóstico definitivo de alergia a leche siguiendo el protocolo descrito -Ver Métodos-. En este grupo de pacientes con un fenotipo tan específico, con clínica exclusivamente digestiva, se ha analizado su perfil de sensibilización a las diferentes proteínas de la leche hallándose que en este caso la sensibilización a la beta-lactoglobulina es

la más frecuente, y postulan que podría ser útil como posible marcador de este fenotipo clínico.^{177,181}

En la mayoría de ensayos y estudios clínicos de alergia alimentaria sólo se realizan la determinación de IgE específica frente leche completa, aunque algunos autores también han determinado niveles de IgE específica a proteínas lácteas individuales. El único ensayo clínico en el que se determina proteínas individuales,⁷⁴ refieren que la media de IgE específica frente a caseína de su población en el grupo activo era de 27 kU/L. En otros estudios como el de González-Jiménez¹²⁶ refieren también los niveles de IgE específica frente a caseína y alfa-lactoalbúmina como importantes tanto a nivel basal como en su disminución tras la ITO.

Es también interesante los niveles obtenidos basalmente de dichas proteínas individuales en el trabajo de Sánchez-García¹²⁷ en el que describen unos niveles medios de IgE específica a cada una de las proteínas de la leche como los niveles en los que los pacientes estudiados no obtuvieron una desensibilización exitosa: caseína de 43,3 kU/l, alfa-lactoalbúmina de 9,44 kU/l y beta-lactoglobulina de 5,29 kU/l. De manera similar los estudios de Zapatero,⁷³ García de Ara¹²⁸ y Patriarca⁶⁶ determinan las 3 proteínas principales de la leche ponderando la importancia del paralelismo entre la determinación de IgE específica frente a caseína respecto a la leche completa.

La determinación de tanto la IgE específica a leche de vaca como a sus proteínas podría ser de especial interés en el seguimiento de pacientes sometidos a desensibilización alimentaria. En algunos estudios¹²⁸ se ha encontrado sólo una disminución estadísticamente significativa tras 12 meses de desensibilización en los niveles de IgE específica frente a caseína (de 0.5 a 12 mg/ml), pero no en los niveles de IgE específica a leche completa o al resto de proteínas de la leche determinadas individualmente. Igualmente Zapatero⁷³ obtiene descensos en los niveles de IgE específica frente a caseína pero no frente a LV o a las otras 2 proteínas de leche de vaca, tanto a los 6 meses como a los 12 meses. En la serie de Martorell⁷⁴ encuentran una disminución tanto en la IgE específica frente a leche completa como a la caseína. En

algunos casos¹²⁶ encontraron que sólo existía descenso significativo de la IgE específica a leche completa y alfa-lactoalbúmina a los 24 meses, y frente a caseína desde los 6 y 12 meses.

En nuestra serie, si bien también se observa una respuesta más intensa en la IgE específica sérica a leche completa y a la caseína,¹⁷⁵ siendo en estas proteínas donde es más destacado el descenso progresivo, hay que considerar que son estos niveles los que se encontraban más elevados de forma basal. Si embargo, durante el periodo amplio de observación de nuestra serie durante los cinco años hemos podido confirmar como se objetivan descensos en la IgE específica para las 3 proteínas de leche.

Por todas estas observaciones referidas, en los estudios posteriores se han seguido estudiando todas estas determinaciones de anticuerpos durante el seguimiento evolutivo,^{67,127} y se analiza la IgE específica a leche completa y a las 3 proteínas principales de la leche: caseína, alfa-lactoalbúmina y betalactoglobulina. Quedan por terminar si el tipo de respuesta observado, con preferencias por una u otra proteína, tiene transcendencia clínica o relevancia pronóstica.

B) Evolución de la IgG específica a leche y sus proteínas

La determinación de los niveles de IgG específica han sido históricamente cuestionados en los procesos alérgicos, tanto para el diagnóstico inicial como para el seguimiento del tratamiento con inmunoterapia.⁸⁷ Sin embargo, la necesidad de poder contar con herramientas útiles y sencillas de determinar para realizar la valoración del nivel de eficacia de los tratamientos en los procesos alérgicos.

Los niveles de IgG específica frente a leche o frente a las proteínas de la leche no se correlacionan directamente con la severidad de la enfermedad ni tienen, como tal, un valor diagnóstico. Sin embargo, el cambio observado en los niveles de estos anticuerpos, sobre todo los de la IgG específica de tipo 4 o IgG4, podrían indicarnos la aparición o el desarrollo de tolerancia inmunológica para poder alcanzar la tolerancia completa deseada, como ya se conoce en otras terapias hiposensibilizantes alérgicas.⁸⁸

El conocimiento que existía previamente sobre la utilidad de la IgG4 específica como marcador de eficacia en inmunoterapia,⁸⁷⁻⁸⁸ impulsó inicialmente su uso como método de valoración evolutiva en el seguimiento de la desensibilización alimentaria. En casi todas estas series de pacientes descritas⁶⁸⁻⁷⁴ se ha valorado cómo se produce el incremento gradual de los niveles de IgG4 específica a leche para alcanzar de esta forma la modulación de la respuesta alérgica y lograr la tolerancia inmunológica y clínica. Este cambio en el ratio IgE/IgG4 específicas es variable pero parece que se hace más significativo cuanto más prolongado sea el tiempo de tratamiento.^{70-72,101}

En algunas series de pacientes con alergia a leche de vaca se han postulado diferentes valores de IgG₄ específica como 6,3 µg/ml⁷⁰ ó 4,37 µg/ml⁷² como posibles puntos de corte por encima de los cuales se podría considerar que se ha alcanzado la tolerancia.

Además en estudios como el de Skripak⁷⁰ se encontraron elevaciones intensas de hasta un 767% de media de la IgG₄ específica a leche en el grupo activo tras la desensibilización alimentaria frente al aumento de tan solo el 14% en el grupo placebo. Adicionalmente se determinó un aumento en paralelo también de la IgG específica frente a leche e hipotetizan con la posible implicación de otras subclases de IgG.

Igualmente, en la serie de Pajno⁷² también encontraron cambios en el grupo activo tras desensibilización alimentaria de la IgG₄ específica a leche, con un aumento del 472% respecto al 40% del grupo placebo. En el grupo de Frischmeyer-Guerrero^{102,104} también encontraron elevaciones de los niveles de IgG específica al final del proceso con inmunoterapia oral y sublingual en su serie, corroborando los hallazgos previos.

La existencia de niveles altos de IgG, IgG₁ y IgG₄ específicas frente a caseína y beta-lactoglobulina previos a la desensibilización se ha considerado como de posible valor pronóstico para que la inmunoterapia oral resulte fallida,^{121,122} aunque los niveles de estos parámetros, IgG, IgG₁, IgG₄ específicas frente a leche, habitualmente aumentan tras una inmunoterapia oral exitosa en paralelo a la disminución de los niveles de IgE específica.

En nuestra serie de pacientes la respuesta de la IgG₄ específica en general se ha podido comprobar que se comporta igualmente en ascenso progresivo de forma inversa a la IgE específica a leche,¹⁷⁵ aunque también se observan variaciones importantes en algunos casos como ya sucedía con la IgE específica a leche, siendo esta respuesta de intensidad y velocidad variable .

Analizando la evolución a largo plazo recogida en los pacientes de esta serie, hemos podido comprobar la existencia de una serie de limitaciones para el uso de la IgG específica como marcador evolutivo durante la desensibilización alimentaria:

- En algunos pacientes aunque disminuyen los niveles de IgE específica a leche de vaca y se objetiva la tolerancia clínica, existe una pobre respuesta de la IgG4 específica a leche durante el seguimiento de 5 años de tratamiento.
- La respuesta de la IgG4 específica a leche es variable también en intensidad y velocidad, a veces es inmediata e intensa y otras veces más lenta aunque aumentando progresivamente, y alcanzando cifras elevadas al final del seguimiento.
- La técnica de laboratorio de nuestro laboratorio ofrecía como gran limitación el tener un punto de corte superior de detección de 30 kU/l, por lo que una vez alcanzada esa cifra no era posible realizar un seguimiento evolutivo más exacto y desconocemos las cifras máximas o definitivas que alcanzaron los pacientes.

Aunque siendo conscientes de las limitaciones que ofrece extraer conclusiones de una muestra de pacientes pequeña, y sin pretender establecer reglas o conclusiones definitivas, creemos que el haber podido realizar el seguimiento a tan largo plazo durante 5 años, creemos que le infiere el valor suficiente como para intentar deducir cómo se comportan este tipo de pacientes tan específicos con anafilaxia por leche de vaca durante la desensibilización alimentaria.

En el caso de la IgG específica a leche hemos podido comprobar que la respuesta observada es tan variable que incluso en esta muestra de pacientes se puede observar. Si bien en algunos casos la respuesta es intensa y precoz –ver resultado– desde las primeras determinaciones, en otros casos la respuesta es débil, siendo en algunos casos casi nula.

El hecho de que incluso en pacientes que muestran una respuesta casi nula de la IgG4 específica a leche tras la desensibilización alimentaria, la respuesta de la IgE específica sí ha sido satisfactoria mostrando el descenso esperado,¹⁷³⁻¹⁷⁵ y clínicamente se ha comprobado la buena evolución de estos pacientes con tolerancia adecuada a la dosis de leche diaria, nos hace suponer que deben existir otros mecanismos de regulación inmunológica que son modificados durante la inmunoterapia oral alimentaria, y que por tanto, sería necesario encontrar otro tipo de marcadores biológicos que nos ayuden a valorar la evolución del paciente.

5.3.- TERCERA FASE DEL ESTUDIO:

Valoración de las reacciones adversas registradas durante la desensibilización alimentaria con leche, cofactores asociados y posibles medidas para controlarlas.

A) Tipos de reacciones adversas y frecuencia observada

La frecuencia de las reacciones adversas en domicilio durante la fase de mantenimiento de la desensibilización oral alimentaria son variables, aunque parece haber acuerdo entre los autores -al menos con la leche- en que éstas se concentran principalmente en los primeros 2 años del procedimiento, y que su intensidad y frecuencia se van atenuando a medida que pasan los meses de tratamiento desensibilizante.⁶⁶⁻⁷⁴

En las primeras series de pacientes^{67,68} los autores ya destacaban que en la mayoría de los pacientes se registraban reacciones adversas leves durante la fase de mantenimiento y un porcentaje menor presentaban reacciones consideradas como moderadas, aunque generalmente para su control sólo precisaban antihistamínicos y sólo en algunos casos asociaban corticoides orales.

En otras series más amplias como la de Patriarca⁶⁹ se vuelven a repetir estos resultados, confirmando el autor que ninguno de sus pacientes presentó reacciones adversas moderadas o severas que precisaran el uso de adrenalina o su ingreso hospitalario. En la serie de Skripak,⁷⁰ el autor destaca que a pesar de la severidad de la alergia alimentaria que presentaban los pacientes de forma basal, durante la desensibilización alimentaria sólo fue necesario el uso de adrenalina en sólo 2 de los 13 pacientes de su grupo.

Posteriormente, en el estudio de Pajno⁷² de los 13 pacientes del grupo activo que recibieron el tratamiento desensibilizante, sólo en dos pacientes manifestaron síntomas sistémicos que precisaron adrenalina y un paciente urticaria generalizada, siendo leves o escasas en el resto de los casos.

En el grupo de Zapatero⁷³ de un total de 18 pacientes sólo en 2 casos se registraron manifestaciones sistémicas que precisaron del uso de adrenalina, aunque finalmente completaron el protocolo con éxito. Sin embargo los autores destacan que en un paciente se suspendió el procedimiento porque los síntomas mucosos (prurito y edema en mucosa oral y faríngea) no eran controlables con tratamiento farmacológico.

En la serie de pacientes de Narisety⁷¹ se analizó y cuantificó el número de reacciones adversas que se registran durante el proceso de desensibilización alimentaria a leche. De un total de 2465 dosis de leche administradas, en 419 se registraron reacciones de tipo leve, en 90 reacciones digestivas, y en 21 reacciones de tipo respiratorio. En este caso se precisó administrar adrenalina en 5 ocasiones y no se registraron complicaciones graves.

En el grupo de Barbi¹²⁹ se registraron en casi la mitad de los casos reacciones menores o leves como prurito oral autolimitado o dolor abdominal leve, que en general no precisaron tratamiento para su control. En casi un 30% manifestaron de 1 a 5 reacciones, el 23,5% presentaron de 5 a 15 reacciones, y en el 10,7% se contabilizaron más de 15 reacciones. En cuanto al tipo de manifestación clínica presentada, en casi la mitad de los casos las reacciones implicaron al aparato respiratorio, en el 28,8% al aparato digestivo, y en el 23,5% las manifestaciones fueron cutáneas como urticaria, angioedema, etc.

En la serie de pacientes del presente estudio¹⁷⁶ vemos que durante el periodo de mantenimiento de la desensibilización en domicilio la mayoría de las reacciones adversas se concentraron en los primeros 12 meses, y fueron disminuyendo en frecuencia e intensidad progresivamente, siendo ya raras tras los primeros 18 meses. De todas las reacciones presentadas, las más frecuentes serían las reacciones leves de mucosa oral en la práctica totalidad de pacientes durante los primeros meses, sobretodo en la fase de incremento de dosis, sobretodo en los primeros 12 meses.

El segundo más frecuente serían las manifestaciones digestivas, que si bien son más leves se muestran más persistentes en el tiempo, pudiendo aparecer en algunos pacientes incluso después de 3 años de seguimiento, aunque con una intensidad y frecuencia menor, con tendencia a ser intermitente en su presentación.

Las manifestaciones cutáneas y respiratorias parecen limitarse más claramente al periodo inicial de 12-18 meses, y aparecieron generalmente al asociarse en algunos pacientes a cofactores tras los primeros 12 meses como ya apuntaban otros autores.⁶⁸⁻⁷⁴ Las reacciones graves o anafilaxia igualmente mostraron la misma tendencia, concentrándose en el periodo inicial de 12 meses y en ningún caso fueron de gravedad importante siendo bien controladas con las pautas establecidas, lo cual corrobora los resultados de series previas, en las que a pesar de la severidad inicial mostrada por los pacientes, la severidad de las reacciones adversas eran inferiores a lo esperado. De forma similar a lo descrito por otros autores,⁶⁸⁻⁷¹ en la serie presentada en este trabajo, vemos como el tratamiento más utilizado fueron los antihistamínicos en casi el 90% de los casos, y sólo precisaron utilizar adrenalina 3 pacientes siguiendo el protocolo establecido – ver Anexo 2-.

En el trabajo de Vazquez-Ortiz¹³⁰ se asoció la IgE específica frente a leche elevada, de clase V y VI de InmunoCAP,¹¹³ con la dificultad en la resolución de reacciones adversas durante la desensibilización, así como la aparición de reacciones adversas recurrentes durante el tratamiento de inmunoterapia oral con leche. Hay que matizar que la clasificación de los niveles de IgE específica en clases es en sí mismo un método arbitrario establecido por los fabricantes de los diferentes métodos de enzimoimmunoensayo disponibles.

En ese sentido, en otro estudio de Barbi¹³¹ se han obtenido unos puntos de corte que determinan la mayor o menor probabilidad de tener diferentes tipo de reacciones durante la desensibilización alimentaria. Estos niveles de IgE específica basal a leche completa por encima de los cuales se tiene una mayor probabilidad de tener una reacción serían: de 45,5 kU/l para una reacción de

tipo leve -mediana clase IV de InmunoCAP-, 70.8 kU/l para una reacción moderada -mediana clase V de InmunoCAP- y finalmente 82,9 kU/l para una reacción grave -mediana clase VI de InmunoCAP-.^{129,131}

B) Cofactores asociados a las reacciones adversas

Desde las primeras series de pacientes ha aparecido reflejado en la literatura la posible implicación de diversos factores como favorecedores de las reacciones adversas que aparecían en la fase de mantenimiento de la desensibilización alimentaria. Staden⁶⁸ describían la asociación hallada con factores como procesos infecciosos intercurrentes, actividad física posterior a la ingesta, exacerbación de rinitis polínica concomitante, o la ingesta irregular de la dosis diaria de leche.

En la serie de Barbi,¹²⁹ el autor recoge de forma exhaustiva la frecuencia de las reacciones adversas y la asociación o no con factores inductores, y observa como en casi el 30% de las reacciones presentadas por los pacientes no fue posible identificar si existía algún factor favorecedor que precipitara la reacción. En el resto de casos, en un 27,4% se atribuía al incremento de dosis que le correspondía ese día, lo cual sólo afectaba a los que se encontraban en el periodo de inducción inicial de tolerancia.

En la fase de mantenimiento de la desensibilización, ya con una dosis fija diaria de leche, se pudieron registrar diversos factores que parecían estar implicados y se identificaron como factores favorecedores o precipitantes de la reacción adversa: la actividad física en el 21,9%, infección concomitante en 17,8%, y ya menos frecuentes con un 4% por la retirada del tratamiento de mantenimiento como antihistamínicos o broncodilatadores, o durante un periodo de exacerbación de su patología respiratoria alérgica de base como la rinitis o el asma por polen durante el periodo de polinización.¹²⁹

En estudios posteriores algunos autores coinciden en la importancia de detectar la coexistencia de este tipo de factores favorecedores,⁷⁰⁻⁷² sobretodo el ejercicio físico y los procesos infecciosos, pero no realizan un análisis tan exhaustivo como Barbi.

En nuestra serie también hemos podido detectar la existencia de estos cofactores durante el periodo de seguimiento,¹⁷⁶ corroborando los resultados de estudios previos siendo las infecciones respiratorias y el ejercicio físico los factores que con más frecuencia aparecieron relacionados con la aparición de estas reacciones adversas. Sin embargo, creemos destacable que como tercera causa aparecen los factores emocionales o estrés, en casi 1 de cada 5 reacciones adversas.

Creemos relevante considerarlo porque en nuestra experiencia situaciones cotidianas como exámenes importantes, discusiones familiares, estrés emocional, etc, hemos podido comprobar que en determinados pacientes condicionan la aparición de estos episodios adversos.¹⁷⁶ Por último, la relación entre estos episodios y el uso concomitante de AINEs ha sido detectado en el 18% de las reacciones adversas registradas, principalmente con el ibuprofeno, como ya se ha apuntado en series previas.¹²⁹

La detección de estos factores favorecedores o precipitantes en los estudios previos ha sido de especial importancia a la hora de mejorar los protocolos de desensibilización alimentaria actuales y futuros. Con estos datos se pueden incluir nuevas recomendaciones para el paciente y su familia a la hora de realizar el mantenimiento en domicilio, como son:

- No realizar ejercicio físico intenso en las siguientes 2-3 horas tras la toma de la leche.¹³²
- Evitar la exposición solar prologada e intensa en las siguientes 2-3 horas tras la toma de leche.
- Vigilar la aparición de clínica sospechosa de proceso infeccioso intercurrente para administrar tratamiento preventivo para las reacciones adversas o disminuir transitoriamente la dosis diaria de

leche.

- Evitar el uso concomitante de determinados fármacos en la misma toma que la leche (AINEs), etc.

La aplicación de estas medidas se espera que ayude a disminuir la aparición de estas reacciones adversas, mejore los resultados esperados con una mayor tolerancia y calidad de vida.

También aparece como de especial interés el considerar ofrecerle a los pacientes y su familia una línea de contacto continuada de consulta ya sea por correo electrónico o vía telefónica, a ser posible las 24 horas, para poder resolver de forma precoz las dudas sobre cómo actuar ante reacciones adversas o conflictos cotidianos que interfieren en el mantenimiento correcto de la dosis como apuntan algunos autores,¹²⁹ y que hemos podido corroborar en nuestra serie.

La implantación de una línea constante de comunicación entre el médico responsable y el paciente, consideramos que es uno de los principales motivos por los cuales en el presente estudio se ha alcanzado esta alta tasa de adherencia terapéutica.¹⁷⁶

5.4.- CUARTA FASE DEL ESTUDIO:

Búsqueda de posibles biomarcadores relevantes en el seguimiento del procedimiento de desensibilización alimentaria con leche.

Tras analizar los resultados obtenidos en la fase previa del estudio y considerando que el estudio de los marcadores biológicos disponibles que analizan la respuesta humoral, IgE e IgG específica, no parecían suficientes por sí solos para explicar y valorar la evolución de los pacientes que siguen terapia de desensibilización alimentaria, se continuó con otra línea de investigación incluyendo el estudio de otra serie de marcadores que abarcaran la actividad inmunológica celular tipo Th1, Th2, Treg y Th17, junto con otros factores proinflamatorios.

El procedimiento de desensibilización alérgica alimentaria es un método específico dirigido contra un antígeno concreto o alimento en este caso, que inicialmente modula la respuesta efectora celular y previene la degranulación mastocitaria, lo cual protege a los pacientes de reacciones graves como la anafilaxia ante la exposición a los alimentos por lo que puede considerarse un método válido para obtener inmunotolerancia protectora según han postulado diversos autores⁶⁷⁻⁷⁴

Por otro lado, el mantenimiento de esta terapia durante periodos prolongados parece demostrado que puede modular a su vez la respuesta humoral con cambios que conducen hacia la inmunomodulación de una forma más definitiva,⁶⁸⁻⁷⁴ aunque la respuesta celular aún es poco conocida.

Por tanto, el protocolo de desensibilización a leche es un método terapéutico que se ha mostrado efectivo a corto y largo plazo en pacientes con alergia persistente, incluso en pacientes con formas clínicas más graves o anafilaxia,¹⁷⁸ alcanzando la tolerancia clínica en la mayoría de los casos, aunque la tolerancia inmunológica todavía no está aclarada.

Dado que la alergia alimentaria es el resultado de una alteración en el correcto desarrollo de la tolerancia oral a los alimentos, la elección de la vía

oral en la inmunoterapia con alimentos resulta ventajosa para alcanzar al sistema inmune localizado en la vía digestiva y que actúa en la inducción de tolerancia oral. Los mecanismos que pueden estar implicados en la desensibilización alimentaria pueden ser varios, por una parte humorales, como el aumento de IgG4 específica a leche con descenso de los niveles de IgE específica como hemos comentado en la Fase 2 del estudio, aunque existen también otros posibles mecanismos celulares implicados como un descenso en la activación de células mastocitarias y los basófilos, lo cual abarca a todas sus citoquinas relacionadas.¹⁴⁸

De todas las citoquinas analizadas -Ver métodos- sólo se obtuvieron resultados significativos en algunos factores y quimiocinas.¹⁷⁹ Entre ellos se encuentran diferentes factores asociados a plaquetas proinflamatorios, como el PDGF y VEGF-A. En nuestra muestra de pacientes hemos encontrado unos niveles basales más elevados en el grupo de pacientes con alergia grave (anafilaxia) a leche de vaca comparados con los niveles del grupo control no alérgico. Además, hemos comprobado como estos niveles posteriormente disminuían tras la aplicación del procedimiento de desensibilización alimentaria con leche, mientras que estos cambios no se producían en el grupo control tras el seguimiento clínico del estudio.

Observamos como a los 6 meses de completar el procedimiento de desensibilización alimentaria, el grupo de pacientes alérgicos a leche experimentó un descenso significativo ($p < 0.05$) de los niveles de los factores angiogénicos PDGF y VEGF-A en comparación con sus niveles basales previos al procedimiento, y este descenso continuó hasta los 12 meses. Posteriormente no se obtuvieron variaciones relevantes.¹⁷⁹

El efecto inmunomodulador observado, con descenso de VEGF y PDGF,¹⁷⁹ tras la desensibilización rápida que bloquea la degranulación mastocitaria y protege frente a la anafilaxia por antígenos determinados como fármacos o alimentos, demuestra la eficacia de este método para alcanzar una inmunotolerancia temporal.¹⁴⁸ La vinculación establecida entre los canales de calcio voltaje-dependientes de los receptores beta-adrenérgicos de la

musculatura de la vía respiratoria y los cambios en los niveles de PDGF,^{157,158} podrían estar relacionados con el resultado de la degranulación mastocitaria y el reclutamiento celular inflamatorio en respuesta a una exposición antigénica específica continua.¹⁵⁹

Otros factores quimiotácticos celulares como MIP-1alfa, en macrófagos, células dendríticas y linfocitos, y MCP-1, en monocitos y basófilos, mostraron inicialmente en estos pacientes alérgicos a alimentos unos valores disminuidos en comparación con sujetos sanos, para posteriormente ascender de forma significativa ($p < 0,05$) tras la desensibilización oral alimentaria con leche en los siguientes dos años de seguimiento, como hemos descrito previamente.¹⁷⁸

MCP-1 está implicada en la patogénesis de varias enfermedades que se caracterizan por infiltrados monocíticos, tales como la psoriasis, la artritis reumatoide y la aterosclerosis.¹⁴⁹ Se ha demostrado que la administración de anticuerpos anti-CCL2 en un modelo de glomerulonefritis reduce la infiltración de macrófagos y células T, reduce la formación de media luna, así como la cicatrización y la insuficiencia renal.¹⁵⁰ Además está involucrada en procesos neuroinflamatorios así como en la fase tardía de las reacciones alérgicas en la que también se induce la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y otras diferentes citocinas por parte de mastocitos y basófilos activados.¹⁵¹

En nuestro estudio hemos observado que niños con alergia a proteínas de la leche de vaca tenían unos niveles medios de MCP-1 que fueron significativamente inferiores respecto a los niños con atopia pero sin alergia a leche.¹⁷⁸ Esta supresión basal de la proteína MCP-1 secretada por los macrófagos M2 cuyo perfil de secreción es de tipo antiinflamatorio en los niños alérgicos a proteínas de leche de vaca podría llegar a indicar que estos pacientes tendrían suprimida esta respuesta, y sería quizás un pilar defectuoso en el equilibrio inmunológico que haría a esos pacientes no poder tolerar inicialmente estas proteínas de leche. Esto hace pensar que tal vez fuera una diana terapéutica susceptible de ser considerada en el futuro.

La evidencia posterior en el seguimiento realizado a medio plazo observándose que MCP-1 se normaliza con un aumento lento pero progresivo hasta llegar a los niveles de los niños atópicos, y con unos niveles que duplican los basales a los 18 meses tras la tolerancia clínica a la leche de vaca hacen pensar en la posibilidad de que MCP-1 podría estar implicada en el desarrollo de la tolerancia clínica en alergia alimentaria.¹⁷⁸ El posterior aumento a los 24 meses en hasta 3 veces respecto al basal podría ser considerado como una explicación que este desbalance se normalizara en pacientes con un claro déficit previo.

Los macrófagos M1, producidos en presencia de GM-CSF se ha visto que producen citoquinas proinflamatorias como IL-23, IL-12, IL-1 β , IL-6, y TNF α , en respuesta a *Mycobacterium* y promueven inmunidad de tipo Th1, es decir pro-Th1. Por contra, los macrófagos inducidos por M-CSF o M2 secretan IL-10 en respuesta a estímulos externos, inhiben respuestas Th1, y se han implicado en la inducción de tolerancia.¹⁵²

Los macrófagos M2 actúan como moduladores de autoinmunidad, induciendo células Treg e inhibiendo la diferenciación de linfocitos Th1 y Th17¹⁵³ y por ello considerados como antiinflamatorios, jugando un papel opuesto a los M1 durante la respuesta inmunitaria. Desde el punto de vista funcional, ambas poblaciones de macrófagos también se comportan de forma diferente. Además los macrófagos M2 secretan constitutivamente MCP-1 o CCL2 y altos niveles de IL-10 mientras IL-8 es sólo secretada por M1. A su vez, ambos tipos de macrófagos son capaces de secretar CXCL10, CCL3 o MIP-1 α , CCL4 o MIP-1 β , y CCL5 o RANTES tras estimulación con LPS.

En cuanto al significado de los cambios de la MIP-1alfa, también llamada CCL3, una proteína capaz de ser secretada por ambos tipos de macrófagos, M1 y M2, la conclusión es mucho más oscura.¹⁵⁴ Su función, fuera de la conocida actividad de inhibir la infección del retrovirus VIH en determinadas células, es la de un importante papel en la inflamación,¹⁵⁵ se conoce que puede tener una actividad inhibitoria y de que tiene una actividad pro-inflamatoria, su principal papel es el de inhibidor de células progenitoras de

la médula ósea. Sin embargo, no está claro ese papel pues ratones con déficit genético de dicha proteína, no tienen repercusión alguna en su médula ósea, probablemente por su acción redundante con otras citocinas tales como MIP-1 beta, RANTES y TGF- β -1. Con estas no solo comparte funciones biológicas sino también su receptor por lo que sugeriría la clara redundancia sustancial que puede existir entre diferentes quimioquinas y que cada una individualmente no podría ser imprescindible en la respuesta inflamatoria.¹⁵⁵

MIP-1 α juega un papel importante en el desarrollo de la lesión pulmonar en estos modelos dependientes de neutrófilos. El papel de MIP-1 α parece estar relacionado con la producción de TNF- α , que a su vez regula las moléculas de adhesión vascular necesarios para la afluencia de neutrófilos.¹⁵⁶

En nuestro estudio hemos observado que niños con alergia a proteínas de la leche de vaca tenían unos niveles medios de MIP1- α que fueron significativamente inferiores respecto a los niños con atopia pero sin alergia a leche respecto.¹⁷⁸ Esta supresión basal de la proteína MIP1- α secretada por ambos tipos de macrófagos M1 y M2 en los niños alérgicos a proteínas de leche de vaca podría llegar a ser un indicador que estos pacientes tendrían suprimida esta respuesta, pero sería posiblemente compensada por las proteínas redundantes de este sistema basado en la homeostasis. La susceptibilidad como diana terapéutica en este caso sería dependiente de obtener conocimientos sobre su función más allá de las conocidas. El posterior aumento a medio plazo observándose que los niveles de MIP1- α se normalizan respecto a los niveles de los niños atópicos con un aumento progresivo a los 18 y 24 meses no podemos en este caso enlazarla a la tolerancia clínica a la leche de vaca.¹⁷⁸ Probablemente otras citocinas hacen que los cambios en MIP1- α puedan no tener una importancia crucial, pero se necesitan muchos más estudios que profundicen en la relación entre esta quimioquina y enfermedades alérgicas.

Llama la atención que no se hallaron cambios significativos en los niveles séricos de otras citoquinas relacionadas con la respuesta Th1, Th2,

Th17 o Treg -Ver Introducción- durante el seguimiento evolutivo realizado.¹⁷⁸⁻¹⁷⁹ Aunque los cambios se mostraban próximos a ser significativos ($p < 0.1$) en algunos mediadores como la IL-4 y IL-5 ($p = 0,06$), IL-1Beta y IL-12 p40 ($p = 0,08$) o la eotaxina ($p = 0.07$), los resultados no llegaron a alcanzar la significancia estadística, pero se observa que mostraban una tendencia hacia el descenso al igual que con PDGF y VEGF-A. Sin embargo, la escasa variación cuantitativa y el amplio rango que mostraban no permiten extraer datos concluyentes. Del mismo modo, en otros factores como Beta-NGF y GM-CSF tampoco se encontraron tendencias significativas, con valores similares durante todo el seguimiento.

En las citoquinas estudiadas en las que no se han hallado diferencias significativas ni tendencias evidentes, en algunos casos creemos que la técnica empleada no es la óptima para detectar los posibles cambios ya que en las muestras analizadas vemos que sus valores eran muy bajos. Sería deseable en futuros ensayos intentar su detección por otros métodos que mejoren la sensibilidad diagnóstica.

Todos estos resultados obtenidos analizados de forma global pueden justificarse como una posible expresión del efecto inmunomodulador obtenido con la inmunoterapia oral con alimentos. El hallazgo de un descenso precoz de tanto los niveles de IgE específica como hemos descrito,¹⁷⁸ así como la normalización de los factores mastocitarios y proinflamatorios,¹⁷⁹ podrían apuntar hacia el éxito de la terapia de desensibilización oral, incluso en aquellos pacientes con niveles de sensibilización elevados a proteínas de leche como es el caso de nuestra serie de pacientes.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la desensibilización alimentaria es un complejo proceso que potencialmente puede inducir cambios inmunológicos precoces, no sólo en la respuesta humoral sino también en marcadores de actividad celular mastocitaria, como los factores angiogénicos y quimiotácticos celulares descritos, y que por tanto que todos estos factores podrían ser útiles en el seguimiento inmunológico de pacientes durante la inmunoterapia oral con alimentos.

Aunque ésta es la primera descripción de factores angiogénicos¹⁷⁹ - PDGF y VEGF- y citoquinas celulares¹⁷⁸ -MIP-1 y MCP-1alfa- estableciendo una posible vinculación con la desensibilización a alimentos en pacientes humanos con anafilaxia, los resultados parecen significativos y creemos que son necesarios encontrar más marcadores biológicos que caractericen la patogénesis de esta enfermedad.

5.5.- QUINTA FASE DEL ESTUDIO:

Búsqueda de biomarcadores útiles en el diagnóstico diferencial con otras enfermedades inmunológicas inducidas por alimento.

Los resultados obtenidos en esta parte del estudio parecen apuntar el posible uso de algunas de estas citoquinas como marcadores biológicos que pueden ayudarnos a discriminar entre individuos sanos, celíacos y alérgicos a leche.¹⁸⁰ Podemos observar como la Eotaxina, la IL-8 o la IL-17 mostraron valores superiores en ambos grupos de pacientes con respecto al grupo control, aunque estas diferencias no alcanzaran significancia estadística, a pesar de que la tendencia era llamativa en un primer momento.

En otros factores se muestran ciertas diferencias entre los valores de las citoquinas de ambos grupos de pacientes, como la IP-10, marcadamente superior en el grupo de pacientes alérgicos a leche con respecto a los celíacos y que alcanzó la diferencia significativa.¹⁸⁰ Por tanto, la IP-10 podría servir de marcador diferenciador en el caso de precisar un diagnóstico diferencial entre alergia alimentaria y celiaquía en pacientes con clínica digestiva confusa.

La expresión de la *Proteína inducible por IFN-gamma* o IP-10 o CXCL10, se ha relacionado con la inflamación en diferentes patologías. Esta quimioquina es secretada por diferentes tipos celulares, como por ejemplo monocitos, células dendríticas, células endoteliales y epiteliales o queratinocitos, en respuesta al estímulo por IFN-gamma.¹⁶⁰ Las quimioquinas tipo CXCL inicialmente atraen a linfocitos Th1 y neutrófilos, y los receptores de CXC se encuentran predominantemente en los linfocitos Th1.¹⁶¹

La estimulación con histamina muestra efectos similares tanto en los monocitos como en las células dendríticas, con regulación negativa de IP-10 inducida por receptores TLR3. Este podría ser un mecanismo por el cual la histamina impulsa la respuesta Th2.¹⁶²

Debido al importante papel que la IP-10 juega en la inflamación y su papel crucial en el reclutamiento de linfocitos Th1 en los tejidos, se ha

estudiado la asociación de la IP-10 con enfermedades inflamatorias y alérgicas, incluyendo dermatitis de contacto, dermatitis atópica y enfermedades pulmonares con inflamación alérgica.^{163,164}

Se ha demostrado que tiene un papel relevante en la inflamación alérgica crónica siendo detectado en los lavados nasales de pacientes con alergia respiratoria.¹⁶⁵ También se ha demostrado su papel en enfermedades pulmonares agudas de origen infeccioso, siendo propuesto como marcador en las exacerbaciones asmáticas inducidas por rinovirus,¹⁶⁶ en bronquiolitis¹⁶⁷ o tuberculosis.¹⁶⁸ Recientemente algunos autores han propuesto a la citocina IP-10 como marcador de inflamación de carácter más agresivo en las tiroiditis y por tanto, con mayor riesgo de producir hipotiroidismo residual.¹⁶⁹

Debido al importante papel que la IP-10 tiene como citoquina Th1 y su relevancia en diversas enfermedades inflamatorias, se ha investigado su posible papel como diana terapéutica.¹⁷⁰ En algunos ensayos se ha valorado el uso de anticuerpos anti-IP-10 demostrando el descenso de las manifestaciones histológicas y clínicas en un modelo experimental de encefalomiелitis. Si se bloquea la IP-10 y CXCR3 también se observa que disminuye la inflamación en un modelo de colitis en ratones.¹⁷¹ Más recientemente se ha propuesto la detección de IP-10 como método sensible para detectar in vitro linfocitos T reactivos al gluten en pacientes celíacos HLA-DQ2-5.¹⁷²

Según los resultados obtenidos, sería posible que la IP-10 fuera considerada de utilidad en el diagnóstico diferencial entre celiaquía y alergia alimentaria, así como un factor predictivo de respuesta favorable al tratamiento con inmunoterapia oral con alimentos.¹⁸⁰

En el caso de la IL-12p40 destaca como se obtuvieron valores muy inferiores en el grupo de pacientes celíacos tanto con respecto a los alérgicos a leche como con los controles.¹⁸⁰ Este hecho nos parece relevante al postularse la IL-12p40 también como un posible marcador diferenciador entre estas 2 enfermedades. La IL-1Alfa se mostró invariable entre los controles y celíacos, pero parece mostrar tendencia a ser superior en el grupo de alérgicos a leche, sin embargo estas diferencias no alcanzaron la significación estadística en nuestra serie.¹⁸⁰

Estas tendencias observadas pueden ser de interés y sería deseable realizar nuevos ensayos con un mayor tamaño muestral para comprobar si estas diferencias se mantienen y alcanzan la significancia estadística que corroboren los resultados obtenidos en el presente estudio. Si se confirman estas diferencias en el futuro, estas citoquinas resultarían de utilidad como biomarcadores diferenciadores para permitir discriminar entre individuos sanos y enfermos, y en el diagnóstico diferencial entre celiaquía y alergia a proteínas de leche de vaca.

6.- CONCLUSIONES

1.- El procedimiento de desensibilización alimentaria a leche de vaca utilizado en este estudio es un método válido y eficaz como método terapéutico en pacientes con alergia a proteínas de leche de vaca grave persistente, logrando la tolerancia clínica a corto plazo.

2.- El mantenimiento de forma prolongada de la inmunoterapia oral con leche de vaca en pacientes con alergia a proteínas de leche grave persistente inducen cambios inmunológicos a largo plazo que favorecen la tolerancia de forma definitiva.

3.- El procedimiento de desensibilización alimentaria con leche del presente estudio ha demostrado ser seguro en pacientes con alergia grave a proteínas de leche de vaca, manifestando mayoritariamente reacciones adversas leves y controlables con el protocolo presentado.

4.- Las comorbilidades asociadas del grupo de pacientes con alergia grave a leche de vaca incluidos en el presente trabajo no han impedido que la desensibilización alimentaria se completara con éxito.

5.- La desensibilización oral con leche realizada logra la normalización en la dieta del paciente alérgico grave a proteínas de leche y por tanto mejora la calidad de vida del paciente y su entorno familiar en la muestra seleccionada.

6.- La sensibilización a determinadas proteínas de leche sugiere la existencia de diversos fenotipos clínicos con implicaciones en la presentación clínica y el pronóstico de la alergia a leche.

7.- La determinación de los niveles séricos de IgE específica a leche de vaca y proteínas de leche son útiles en el seguimiento evolutivo durante el procedimiento de desensibilización oral con leche, para valorar la respuesta terapéutica de la sensibilización a proteínas de leche.

8.- La determinación de los niveles séricos de IgG4 específica a leche de vaca y proteínas de leche no ha demostrado ser útil como método de valoración en la evolución durante el procedimiento de desensibilización alimentaria, aunque puede tener relevancia como marcador de exposición.

9.- Otros marcadores biológicos celulares relacionados con la actividad monocítica y mastocitaria -MIP-1 y MCP-1alfa-, y con la actividad plaquetaria y proangiogénica -PDGF y VEGF-A-, pueden ser útiles en el seguimiento de los pacientes durante la desensibilización oral con leche para valorar la inmunomodulación hacia la tolerancia definitiva al alimento.

10.- En el presente estudio no se hallaron cambios significativos en los niveles séricos de citoquinas relacionadas con la respuesta Th1, Th2, Th17 o Treg durante el seguimiento evolutivo realizado que sugieran su posible utilidad como marcadores biológicos en pacientes con alergia a leche de vaca.

11.- La citoquina IP-10 o *proteína inducible por IFN-gamma 10* resulta de utilidad en el presente estudio en el diagnóstico diferencial entre celiaquía y alergia alimentaria, así como un factor predictivo de respuesta favorable al tratamiento de inmunoterapia oral con leche.

7.- BIBLIOGRAFIA

1. Metcalfe DD, Sampson HA, Simon RA. Food allergy. Adverse Reactions to Foods and Food Additives. 4.^a edición, Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd., 2008.
2. American Academy of Allergy and Immunology Committee on Adverse Reactions to Foods and National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Adverse reactions to foods. 1984. NIH Publication N°84-2442.
3. Bruijnzeel-Koomen C, Ortolani C, Aas K, Bindslev-Jensen C, Björkstén B, Moneret-Vautrin D, et al. Adverse reaction to food. Position paper. *Allergy* 1995;50:623-35.
4. Johanson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Review Committee of the World Allergy Organization 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:832-36.
5. Alergia a alimentos. En: *Alergológica*. Sociedad Española de Alergología e Inmunología. Abelló, 1995; 165-183.
6. Dupont C. Food allergy: recent advances in pathophysiology and Diagnosis. *Ann Nutr Metab* 2011; 59:8-18.
7. Sampson H. Adverse reactions to foods. En: Adkinson NF, Yunginger J, Busse W, Bochner BS, Holgate ST, Simmons F, eds. *Middleton's Allergy: Principles and practice (vol III) (6^a ed)*. San Luis: Mosby-Year Book Inc 2003; 1619-43.
8. Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *JACI* 2007;120:638-46.
9. Woods RK, Abramson M, Bailey M, Walters EH. International prevalences of reported food allergies and intolerances. Comparison arising from the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS) 1991-1994. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:298-304.
10. Alergia a alimentos. En: *Alergológica* 2005. Sociedad Española de Alergología e Inmunología. Luzan 5 SA, 2006; 229-253.
11. <https://www.rae.es>
12. <https://es.wikipedia.org/wiki/Leche>
13. <http://www.alergiafbva.es/alergia-a-los-alimentos/23-alergia-a-la-leche/>

14. Bushill JH, Wright W.B. Some physical methods of assessing the effects of processing on the structure and properties of milk, *J. Soc. Dairy Technol.* 1964; 17:3.
15. Dargal Badui, Salvador. *Química de los Alimentos. Cap. 12 Leche.* Edit. Pearson, Addison Wesley. 2006; 4° Edición. p. 614.
16. Larson BL. Biosynthesis and secretion of milk proteins: A review. *J. Dairy Res.* 1979; 46:161.
17. Gresti JM, Bugant M, Maniongui C, Bezard J. Composition of molecular species of triacylglycerols in bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 1993;76:1850-1869.
18. Mercier JC, Ribadeau-Dumas BY, Groscalude S. Aminoacid composition and sequence of bovine κ -casein. *Neth. Milk Dairy* 1985; 27:313.
19. Dalgleish DG, Brinkhuis J, Payens TA. The coagulation of differently sized casins micelles by rennet". *European J. Biochem.* 1981; 119:257.
20. Tejido glandular mamario. En: *Histología humana.* Editor: Bloom-Fawcett, 1999.
21. J.A. Boyce, A. Assa'ad, A. W. Burks, S.M. Jones, H.A. Sampson, R.A. Wood, et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States. Report of the NIAID-Sponsored Expert Panel. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Dec; 126(6 0): S1–58.
22. Sampson HA, Munoz-Furlong A, Bock SA, Schmitt C, Bass R, Chowdhury, B.A. et al. Symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Mar; 115: 584–591.
23. Sicherer SH. Clinical aspects of gastrointestinal food allergy in childhood. *Pediatrics.* 2003 Jun; 111: 1609–1616.
24. Chehade M. and Sampson H.A. The role of lymphocytes in eosinophilic gastrointestinal disorders. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2009 Feb; 29: 149–158.
25. Rothenberg ME. Biology and treatment of eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology.* 2009 Oct; 137: 1238–1249.
26. Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA, Wood R.A., and Sicherer, S.H. Food

- protein-induced enterocolitis syndrome caused by solid food proteins. *Pediatrics*. 2003 Apr; 111: 829–835.
27. Burks W. Skin manifestations of food allergy. *Pediatrics*. 2003 Jun; 111: 1617–1624.
28. Rowlands D, Tofte SJ, and Hanifin JM. Does food allergy cause atopic dermatitis? Food challenge testing to dissociate eczematous from immediate reactions. *Dermatol Ther*. 2006 Mar; 19: 97–103.
29. Warshaw EM, Belsito DV, DeLeo VA, Fowler JF Jr., Maibach HI, Marks JG et al. North American Contact Dermatitis Group patch-test results, 2003-2004 study period. *Dermatitis*. 2008 May; 19: 129–136.
30. James JM. Respiratory manifestations of food allergy. *Pediatrics*. 2003 Jun; 111: 1625–1630.
31. Amado A, Jacob SE. Contact dermatitis caused by foods. *Actas Dermosifiliogr*. 2007 Sep; 98: 452–458.
32. Del Savio B, Sherertz EF. Is allergic contact dermatitis being overlooked?. *Arch Fam Med*. 1994 Jun; 3: 537–543.
33. Malling HJ. Methods of skin test. Position paper: Allergen standardization and skin tests. *Allergy* 1993;48: 55-6.
34. Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *JACI* 2001;107:891-6.
35. Comité de reacciones adversas a alimentos, SEAIC. Metodología diagnóstica en la alergia a los alimentos. *Alergol Inmunol Clin* 1999;14: 50-62.
36. Johansson SGO, Hourihane JOB, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C. Et al. A revised nomenclature task force. *Allergy* 2001; 56:813-24.
37. NIAID-Sponsored Expert Panel. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Report of the NIAID-Sponsored Expert Panel. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(6 Suppl):1-58.
38. Sampson HA. Immunologically mediated food allergy: the importance of food challenge procedures. *Ann Allergy* 1988;60:262-9.
39. Sampson HA. Food Allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1978;62:327-34.

40. Abbas AK, Litchman AH, Pillai S. Diseases caused by Immune Responses. En: Abbas AK et al. Cellular and Molecular Immunology (6ª edición):55-64.
41. ML Sanz et al. Anticuerpos: Síntesis y regulación de la IgE. En: A. Peláez Hernández IJ. Dávila González, editores. Tratado de alergología, tomo 1, (Madrid: Ergon, 2007): página 27-35.
42. Coombs RRA, Gell PGH. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. En: Gell pGH, Coombs RRA, Lackman PJ, eds. Clinical aspects of immunology. 3 ed (Blackwell Scientific Publications, Oxford 1975):761-82.
43. Burks AW, Laubach S, Jones SM. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *JAllergyClinImmunol* 2008;121:1344-50.
44. Bischoff S, Crowe SE. Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives. *Gastroenterology* 2005;128:1089-113.
45. Bellanti JA, Sabra A, Zeligs BJ. Gastrointestinal immunopathology and food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;93:S26-32.
46. Ogra PL. Mucosal immune response in the ear, nose and throat. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:S4-8.
47. Palomares O, Ruckert B, Jartti T, Kucuksezer UC, Puhakka T, Gómez E, Fahrner HB, Speiser A, Jung A, et al. Induction and maintenance of allergen-specific FOXP3 Treg cells in human tonsils as potential first-line organs of oral tolerance. *JACI* 2012;129:510-20.
48. Perry M, Whyte A. Immunology of the tonsils. *Immunol Today* 1998;19:414-21.
49. Scott-Taylor TH, Hourihane JB, Harper J, Strobel S. Patterns of food allergen-specific cytokine production by T lymphocytes of children with multiple allergies. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1473-80.
50. Weiner HL. Oral tolerance. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1994; 91:10762-5.
51. Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *JACI* 2005;115:3-12;3.
52. Vandenplas Y, Koletzko S, Isolauri E, et al. Guidelines for the diagnosis

- and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child*.2007;92:902-8.
53. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *JACI* 2010; 125(S2):S116-125)
54. Host A. Clinical course of cow's milk protein allergy and intolerance. *Pediatr Allergy Immunol*.1998;9(11):48-52.
55. Host A, Halken S, Jacobsen HP, Estmann A, Mortensen S, Mygil S. The natural course of cow's milk protein allergy intolerance. *JACI* 1997;99(1):S490.
56. Bishop JM, Hill DJ, Hosking CS. Natural history of cow's milk allergy: clinical outcome. *Journal of Pediatrics*.1990;116:862-7.
57. Wood RA. The natural history of food allergy. *Pediatrics* 2003;111:1631-7.
58. Thong BY, Horiñana JO. Monitoring of IgE-mediated food allergy in childhood. *Acta Paediatr* 2004;93:759-64.
59. Dannaeus A, Inganas M. A follow-up study of children with food allergy. Clinical course in relation to serum IgE and IgG antibody level to milk, egg and fish. *Clin Allergy* 1981;11:533-9.
60. Pumphrey RS, Gowland MH. Further fatal allergic reactions to food in the United Kingdom, 1999-2006. *JACI* 2007;119:1018-19.
61. Patriarca C, Romano A, Venuti A, Schiavino D, et al. Oral specific hyposensitization in the management of patients allergic to food. *Allergol Immunopathol* 1984;12:275-81.
62. Oppenheimer JJ, Nelson HS, Bock SA, Christensen F, Leung DY. Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1992 Aug;90(2):256-62.
63. Nelson HS, Lahr J, Rule R, Bock A, Leung D. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Jun;99(6,1):744-51.
64. Patriarca G, Schiavino D, Nucera E, Schinco G, Milani A, Gasbarrini GB. Food allergy in children: results of standardized protocol for oral desnsitization. *Hepatogastroenterology* 1998;45:52-58.
65. Bauer A, Ekanayake S, Winger-Alberti, Eisner P. Oral rush desensitization to milk. *Allergy* 1999;54:894-5.

66. Patriarca G, Nucera E, Roncallo C, Pollastrini E, et al. Oral desensitizing treatment in food allergy: Departmental and immunological results. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17:459-65.
67. Meglio P, Bartone E, Plantamura M, Arabito E, Giampietro PG. A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy* 2004;59:980-7.
68. Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Brewe F, Wahn U, Niggemann B, Bayer K. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reactions. *Allergy* 2007;62:1261-69.
69. Patriarca G, Nucera E, Pollastrini E, et al. Oral specific desensitization in food-allergic children. *Dig Dis Sci* 2007;52:1662-72.
70. Skripak JM, Nash SD, Rowley H, Brereton NH, Oh S, Hamilton RG, Matsui EC, Burks AW, Wood RA. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *JACI* 2008;122(6):1154-60.
71. Narisety SD, Skripak JM, Steele P, Hamilton RG, Matsui EC, Burks AW et al. Open-label maintenance after milk oral immunotherapy for IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2009 Sep;124(3):610-2.
72. Pajno GB, Caminiti L, Ruggeri P, De Luca R, Vita D, La Rosa M, Passalacqua G. Oral immunotherapy for cow's milk allergy with a weekly up-dosing regimen: a randomized single-blind controlled study. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010;105(3):376-81.
73. Zapatero L, Alonso E, Fuentes V, Martínez MI. Oral desensitization in children with cow's milk allergy. *J Investig Clin Immunol* 2008;18(5):389-96.
74. Martorell A, De la Hoz B, Ibañez M, Bone J, Terrados MS, Michavila A, Plaza AM, Alonso E, et al. Oral desensitization as a useful treatment in 2-year-old children with cow's milk allergy. *Clin Experimental Allergy.* 2011; 41:1297-1304.
75. Burks AW, Jones SM, Wood RA, Fleischer DM, Sicherer SH, et al. Oral immunotherapy for treatment of egg allergy in children. *NEJM* 2012, July 19; 367(3):233-243.

76. Meglio P, Giampietro PG, Carello R, et al. Oral food desensitization in children with IgE-mediated hen's egg allergy: a new protocol with raw hen's egg. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013 Feb;24(1):75-83.
77. Enrique E, Malek T, Pineda F, Palacios R, Bartra J, Tella R, Basagaña M, Alonso R, Cisteró-Bahíma A. Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a follow-up study. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008 Mar;100(3):283-4. doi: 10.1016/S1081-1206(10)60456-5.
78. Anagnostou K, Islam S, King Y, Foley L, Pasea L, Bond S, Palmer C, Deighton J, Ewan P, Clark A. Assessing the efficacy of oral immunotherapy for the desensitisation of peanut allergy in children (STOP II): a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet*. 2014 Apr 12;383(9925):1297-304.
79. Krishna MT, Huissoon AP. Clinical immunology review series: an approach to desensitization. *Clin Exp Immunol* 2011;163:131-46.
80. Kerzl R, Smonowa A, Ring J, Ollert M, Mempel M. Life-threatening anaphylaxis to kiwi fruit: protective sublingual allergen immunotherapy effect persists even after discontinuation. *JACI* 2007; 119:507-8.
81. Keith CA, Frischmeyer-Guerreiro PA, Thyagarajan A, Schroeder JT, Hamilton RG, et al. The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. *JACI* 129:448-55.
82. Blumchen K, Ulbricht H, Staden U, Dobberstein K, Beschoner J, de Oliveira LC, Schreffler WG, Sampson HA. Oral peanut immunotherapy in children with peanut anaphylaxis. *JACI* 2010;126:83-91.
83. Rolinck-Werninghaus C, Staden U, Mehl A, Hamelmann E, Beyer K, Niggemann B. Specific oral tolerance induction with food in children: transient or persistent effect on food allergy? *Allergy* 2005;60:1320-22.
84. Thong BY, Mirakian R, Castells M, Pichler W, Romano A, Bonadonna P, Diana D, Kowalski M, Yanez A, Leonart R, Sanchez-Borges M, Demoly P. A world allergy organization international survey on diagnostic procedures and therapies in drug allergy/hypersensitivity. *World Allergy Organ J*. 2011 Dec;4(12):257-70.
85. Castells M. Rapid desensitization for hypersensitivity reactions to medications. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2009 Aug;29(3):585-606.
86. Cernadas JR, Brockow K, Romano A, Aberer W, Torres MJ, Bircher A, Campi P, Sanz ML, Castells M, Demoly P, Pichler WJ. General

- considerations on rapid desensitization for drug hypersensitivity -a consensus statement. European Network of Drug Allergy and the EAACI interest group on drug hypersensitivity. *Allergy* 2010;65(11):1357-66.
87. Calderón M, Cardona V, Demoly P. One hundred years of allergen immunotherapy European Academy of Allergy and Clinical Immunology celebration: review of unanswered questions. EAACI 100 Years of Immunotherapy Experts Panel. *Allergy*. 2012 Apr;67(4):462-76.
88. Burks AW, Calderon MA, Casale T, Cox L, Demoly P, Jutel M, Nelson H, Akdis CA. Update on allergy immunotherapy: AAAAI/EAACI/PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:1288-96.
89. Fuentes-Aparicio V, Alonso-Lebrero E, Zapatero L, Infante S, Lorente R, Muñoz-Fernández MA, Correa-Rocha R. Oral immunotherapy in hen's egg-allergic children increases a hypo-proliferative subset of CD4+ T cells that could constitute a marker of tolerance achievement. *Pediatr Allergy Immunol* 2012;23(7):648-53.
90. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:18-27.
91. Fujita H, Soyka MB, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy* 2012;2(1):2.
92. Soyka MB, Holzmann D, Akdis CA. Regulatory cells in allergen-specific immunotherapy. *Immunotherapy*. 2012 Apr;4(4):389-96.
93. Palomares O. The role of regulatory T cells in IgE-mediated food allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2013;23(6):371-82.
94. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009;30:636-45.
95. Varshney P, Jones SM, Scurlock AM, Perry TT, Kemper A, Steele P, et al. A randomized controlled study of peanut oral immunotherapy: clinical desensitization and modulation of the allergic response. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 654-60.
96. Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:328-38.
97. Wanich N, Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA, Shreffler WG. Allergen-specific basophil suppression associated with clinical tolerance in patients

- with milk allergy. *JACI* 2009;123:789-94.
98. Thyagarajan A, Jones SM, Calatroni A, Pons L, Kulis M, Woo CS, Kamalakannan M, Vickery BP, Scurlock AM, Burks AW, Schreffler WG. Evidence of pathway-specific basophil anergy induced by peanut oral immunotherapy in peanut-allergic patients. *Clin Exp Allergy* 2012; 42:1197-205.
99. Vila L, Moreno A, Gamboa PM, Martínez-Aranguren R, Sanz ML. Decrease in antigen-specific CD63 basophil expression is associated with the development of tolerance to egg by SOTI in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2013;24:463-8.
100. Kepley CL. Antigen-induced reduction in mast cell and basophil functional responses due to reduced Syk protein levels. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;138:29-39.
101. Jones SM, Pons L, Roberts JL, Scurlock AM, Perry TT, Kulis M, et al. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *JACI* 2009; 124:292-300.
102. Frischmeyer-Guerrero PA, Chichester K, Bieneman A, Keet C, Wood RA, Schroeder JT. Basophil responses in children undergoing immunotherapy for milk allergy. *JACI* 2011;127:61-71.
103. Ono E, Taniguchi M, Higashi N, Mita H, Kajiwara K, Yamaguchi H, et al. CD203c expression on human basophils is associated with asthma exacerbation. *JACI* 2010;125:483-9.
104. Keet CA, Frischmeyer-Guerrero PA, Thyagarajan A, Schroeder JT, et al. The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(2):448-55.
105. Uermsi C, Beerli RR, Bauer M, Manolova V, Dietmeier K, Buser RB, et al. Mechanisms of allergen-specific desensitization. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:375-83.
106. Schreffler WG, Wanich N, Moloney M, Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *JACI* 2009;123:43-52.
107. Syed A, García MA, Lyu SC, Bucayu R, Kohli A, Ishida S, Berglund Jp, Tsai M, et al. Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box

- protein 3 (FOXP3). JACI 2014; 33(2):500-10.
108. Wu Z. Antigen specific immunotherapy generates CD27+ CD35+ tolerogenic dendritic cells. Cell Immunol 2013;283:75-80.
109. Guía de la EMA. Guideline for Allergen Products: Production and Quality Issues (EMEA/CHMP/BWP/304831/2007)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003327.pdf.
110. Bock S, Buckley J, Holst A, May C. Proper use of skin tests with food extracts in diagnosis of food hypersensitivity. ClinAllergy 1978;8: 559-64.
111. Ortolani C, Ispano M, Pastorello EA, Ansaloni R, Magri GC. Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. J Allergy Clin Immunol 1989;83:683-90.
112. Menardo J, Bousquet J, Rodiere M, Astruc J, Michel FB. Skin test reactivity in infancy. JACI 1985;74:646-51.
113. <http://www.phadia.com/es/5/Productos>.
114. Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. JACI 2001;107:891-6.
115. Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, Blanco C, Ebner C, Hourihane J, et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to food- Position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Allergy 2004;59:690-7.
116. <http://www.ginasthma.org>
117. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma. ARIA workshop report (chairman: Bousquet J). J Allergy Clin Immunol 2001;108:S147-334.
118. Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Guenard L, et al. Oral desensitization in children with milk and egg allergies obtain recovery in a significant proportion of cases: a randomized study in 60 children with cow's milk allergy and 90 children with egg allergy. Eur Ann Allergy Clin Immunol.2007; 39:12-19.
119. Salmivesi S, Korppi M, Mäkelä MJ, Paasilta M. Milk oral immunotherapy is effective in school-aged children. Acta Paediatr. 2013 Feb;102(2):172-6.
120. Longo G, Barbi E, Berti I, Meneghetti R, Pittalis A, Ronfani L, Ventura

- A. Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Feb;121(2):343-7.
121. Savilahti EM, Kuitunen M, Savilahti E, Mäkelä MJ. Specific antibodies in oral immunotherapy for cow's milk allergy: kinetics and prediction of clinical outcome. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014; 164(1):32-9.
122. Savilahti EM, Kuitunen M, Valori M, Rantanen V, Bardina L, Gimenez G, Mäkelä MJ, Hautaniemi S, Savilahti E, Sampson HA. Use of IgE and IgG4 epitope binding to predict the outcome of oral immunotherapy in cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2014 May;25(3):227-35.
123. Takahashi M, Taniuchi S, Soejima K, Hatano Y, Yamanouchi S, Kaneko K. Successful desensitization in a boy with severe cow's milk allergy by a combination therapy using omalizumab and rush oral immunotherapy. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2015 May 28;11(1):18.
124. Lanser BJ, Wright BL, Orgel KA, Vickery BP, Fleischer DM. Current Options for the Treatment of Food Allergy. *Pediatr Clin North Am.* 2015 Dec;62(6):1531-49
125. Nowak-Wegrzyn A, Fiocchi A. Is oral immunotherapy the cure for food allergies?». *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2010;10: 214–219.
126. González Jiménez D, Larrea Tamayo E, Díaz Martín JJ, Molinos Norniella C, Pérez Solis D, Menéndez Arias C, Jiménez Treviño S, Bousoño García C. Oral rush desensitization for cow milk allergy: Clinical and immunological follow-up. *An Pediatr (Barc).* 2013 Dec;79(6):346-51.
127. Sánchez-García S, Rodríguez del Río P, Escudero C, García-Fernández C, Ramirez A, Ibáñez MD. Efficacy of oral immunotherapy protocol for specific oral tolerance induction in children with cow's milk allergy. *Isr Med Assoc J.* 2012 Jan;14(1):43-7.
128. García-Ara C, Pedrosa M, Belver MT, Martín-Muñoz MF, Quirce S, Boyano-Martínez T. Efficacy and safety of oral desensitization in children with cow's milk allergy according to their serum specific IgE level. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013 Apr;110(4):290-4.
129. Barbi E, Longo G, Berti I, et al. Adverse effects during specific oral tolerance induction: in home phase. *Allergol Immunopathol*

- (Madrid)2011.doi:10.1016.
130. Vázquez-Ortiz M, Alvaro-Lozano M, Alsina L, Garcia-Paba MB, Piquer-Gibert M, Giner-Muñoz MT, Lozano J, Domínguez-Sánchez O, Jiménez R, Días M, Martín-Mateos MA, Plaza-Martín AM. Safety and predictors of adverse events during oral immunotherapy for milk allergy: severity of reaction at oral challenge, specific IgE and prick test. *Clin Exp Allergy*. 2013 Jan;43(1):92-102.
 131. Barbi E, Longo G, Berti I, Neri E, Saccari A, Rubert L, Matarazzo L, Montico M, Ventura A. Adverse effects during specific oral tolerance induction: in-hospital "rush" phase. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2012 Feb;44(1):18-25.
 132. Caminiti L, Passalacqua G, Vita D, Ruggeri P, Barberio G, Pajno GB. Food-exercise-induced anaphylaxis in a boy successfully desensitized to cow's milk. *Allergy* 2007;62:335-336.
 133. Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. 105: p. 399-408.
 134. Siddiqui S, Mistry V, Doe C, Roach K, Morgan A, Wardlaw A, Pavord I, Bradding P, Brightling C. Airway hyperresponsiveness is dissociated from airway wall structural remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Aug;122(2):335-41.
 135. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med*. 2002 May 30;346(22):1699-705.
 136. Kraft M, Martin RJ, Lazarus SC, Fahy JV, Boushey HA, Lemanske RF Jr, Szefer SJ; Asthma Clinical Research Network. Airway tissue mast cells in persistent asthma: predictor of treatment failure when patients discontinue inhaled corticosteroids. *Chest*. 2003 Jul;124(1):42-50.
 137. Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, Earl H, Sullivan T. Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Engl J Med*. 1987 Jun 25;316(26):1622-6.
 138. Vadas P, Gold M, Perelman B, Liss GM, Lack G, Blyth T, Simons FE, Simons KJ, Cass D, Yeung J. Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *N Engl J Med*. 2008 Jan 3;358(1):28-35.

139. Burks AW. Factoring PAF in anaphylaxis. *N Engl J Med.* 2008 Jan 3;358(1):79-81.
140. Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG: Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *The Journal of experimental medicine* 1972, 136(6):1356-1377.
141. Vadas P, Perelman B, Liss G: Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013, 131(1):144-149.
142. Vadas P, Perelman B: Effect of epinephrine on platelet-activating factor-stimulated human vascular smooth muscle cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2012, 129(5):1329-1333.]
143. Flamme I, Frolich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *Cell Physiol.* 1997;173:206-10.
144. Puxeddu I, Alian A, Piliponsky AM, Ribatti D, Panet A, Levi-Schaffer F: Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2005, 37(3):628-636.
145. Hoshino M, Nakamura Y, Hamid QA: Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001, 107(6):1034-1038.
146. Bhandari V, Choo-Wing R, Chapoval SP, Lee CG, Tang C, Kim YK, Ma B, Baluk P, Lin MI, McDonald DM et al: Essential role of nitric oxide in VEGF-induced, asthma-like angiogenic, inflammatory, mucus, and physiologic responses in the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103(29):11021-11026.
147. Uutela M, Wirzenius M, Paavonen K, Rajantie I, He Y, Karpanen T, Lohela M, Wiig H, Salven P, Pajusola K et al: PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood* 2004, 104(10):3198-3204.
148. Frischmeyer-Guerrero PA, Guerrero AL, Chichester KL, Bieneman AP, Hamilton RA, Wood RA, Schroeder JT: Dendritic cell and T cell responses in children with food allergy. *Clinical and experimental allergy:*

- journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology 2011, 41(1):61-71.
- 149.Xia M, Sui Z (Mar 2009). Recent developments in CCR2 antagonists". *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 19 (3): 295–303.
- 150.Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TN, Salant DJ, Gutierrez-Ramos JC (Apr 1997). RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine* 185(7): 1371-80.
- 151.Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):445-54.
- 152.Li G, Kim YJ, Broxmeyer HE. Macrophage colony-stimulating factor drives cord blood monocyte differentiation into IL-10(high) IL-12absent dendritic cells with tolerogenic potential. *J Immunol*, 2005. 174(8): p. 4706-17.
- 153.Weber MS, et al. Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nat Med*, 2007. 13(8): p. 935-43.
- 154.Guan E, Wang J, Norcross MA (Apr 2001). Identification of human macrophage inflammatory proteins 1alpha and 1beta as a native secreted heterodimer. *J. Biol. Chem. (United States)* 276 (15): 12404–9.
- 155.Cook DN. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*. 1996 Jan;59(1):61-6.
- 156.Shanley TP1, Schmal H, Friedl HP, Jones ML, Ward PA. Role of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) in acute lung injury in rats. *J Immunol*. 1995 May 1;154(9):4793-802.
- 157.Ikenouchi T, Kume H, Oguma T, Makino Y, Shiraki A, Ito Y, Shimokata K: Role of Ca(2+) mobilization in desensitization of beta-adrenoceptors by platelet-derived growth factor in airway smooth muscle. *European journal of pharmacology* 2008, 591(1-3):259-265.]
158. Suganuma N, Ito S, Aso H, Kondo M, Sato M, et al. STIM1 regulates platelet-derived growth factor-induced migration and Ca²⁺ influx in human airway smooth muscle cells. *PLoS one* 2012, 7(9):e45056.
- 159.Matias V, San Feliciano L, Fernandez JE, Lapena S, Garrido E, Ardura

- J, Soga MJ, Aragon MP, Remesal A, Benito F et al: Host and environmental factors influencing respiratory secretion of pro-wheezing biomarkers in preterm children. *Pediatric allergy and immunology* : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology 2012, 23(5):441-447.
160. Cassatella MA, Gasperini S, Calzetti F, Bertagnin A, Luster AD, McDonald PP: Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils. *Eur J Immunol* 1997;27:111-115.
161. Sallusto F, Lanzavecchia A: Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 2000;177:134-140.
162. Glatzer F, Mommert S, Köther B, Gschwandtner M, et al. Histamine downregulates the Th1-associated chemokine IP-10 in monocytes and myeloid dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;163(1):11-9. doi: 10.1159/000355960. Epub 2013 Nov 16.
163. Medoff BD, Sauty A, Tager AM, Maclean JA, et al. IFN-gamma-inducible protein 10 (CXCL10) contributes to airway hyperreactivity and airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Immunol* 2002;168:5278-5286.
164. Villagomez MT, Bae SJ, Ogawa I, Takenaka M, Katayama I: Tumour necrosis factor-alpha but not interferon-gamma is the main inducer of inducible protein-10 in skin fibroblasts from patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2004;150:910-916.
165. Tworek D, Kuna P, Młynarski W, Górski P, Pietras T, Antczak A. MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) and I-TAC (CXCL11) concentrations after nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis. *Arch Med Sci*. 2013 Oct 31;9(5):849-53. doi: 10.5114/aoms.2013.37198. Epub 2013 Aug 26.
166. Wark PA, Bucchieri F, Johnston SL, Gibson PG, Hamilton L, Mimica J, Zummo G, Holgate ST, Attia J, Thakkinstian A, Davies DE. IFN-gamma-induced protein 10 is a novel biomarker of rhinovirus-induced asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Sep;120(3):586-93. Epub 2007 Jul 12.

167. Zou LP, Xu XJ, Zhang Y, Wang W. Roles of CXCR3 on lymphocytes and IP-10 of peripheral blood in infants with bronchiolitis. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2015 Feb;17(2):155-8.
168. Latorre I, Díaz J, Mialdea I, Serra-Vidal M, Altet N, Prat C, Díez N, Escribano A, Casas I, Rodrigo C, Ausina V, Ruhwald M, Domínguez J. IP-10 is an accurate biomarker for the diagnosis of tuberculosis in children. *J Infect*. 2014 Dec;69(6):590-9. doi: 10.1016/j.jinf.2014.06.013. Epub 2014 Jun 27.
169. Ruffilli I, Ferrari SM, Colaci M, Ferri C, Fallahi P, Antonelli A. IP-10 in autoimmune thyroiditis. *Horm Metab Res*. 2014 Aug;46(9):597-602. doi: 10.1055/s-0034-1382053. Epub 2014 Jun 30.
170. Fife BT, Kennedy KJ, Paniagua MC, Lukacs NW, Kunkel SL, Luster AD, Karpus WJ: CXCL10 (IFN-gamma-inducible protein-10) control of encephalitogenic CD4+ T cell accumulation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2001;166:7617-7624.
171. Singh UP, Venkataraman C, Singh R, Lillard JW Jr: CXCR3 axis: role in inflammatory bowel disease and its therapeutic implication. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2007;7:111-123.
172. Ontiveros N, Tye-Din JA, Hardy MY, Anderson RP. Ex-vivo whole blood secretion of interferon (IFN)- γ and IFN- γ -inducible protein-10 measured by enzyme-linked immunosorbent assay are as sensitive as IFN- γ enzyme-linked immunospot for the detection of gluten-reactive T cells in human leucocyte antigen (HLA)-DQ2·5(+) -associated coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. 2014 Feb;175(2):305-15. doi: 10.1111/cei.12232.
173. Poza-Guedes P, González-Pérez R, Sánchez I, Matheu V. Oral Cow's milk Immunotherapy: clinical and serological data in Long-Term Follow up. *Allergy* 2010; 65 (Suppl. 92): 370-371.
174. Poza-Guedes P, González-Pérez R, Sánchez-Machín I, Matheu V. Long-term follow-up in cow's milk anaphylaxis after successful rush immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* .JACI 2014, March 133:106.
175. Poza-Guedes P, González-Pérez R, Sánchez-Machín I, Matheu Delgado V. Oral cow's milk immunotherapy: clinical and serological data

- in long-term follow up. *Clinical and translational Allergy* 2015;5(Suppl 3):158.
176. Poza-Guedes P, González-Pérez R, Sánchez-Machín I, Matheu V. Oral Cow's Milk Immunotherapy: Relevant Cofactors during Long-Term Follow-up. *JACI* 2015;135(2):257.
177. Matheu V, Poza-Guedes P, Gonzalez R, Sánchez I. Gastrointestinal Phenotype of Cow's Milk Food Allergy: Prevalence. *JACI* 2015;135(2):253.
178. Poza P, González R, Barrios Y, Franco A, Matheu V. MIP-1 α , MCP-1, and desensitization in anaphylaxis from cow's milk. *N Engl J Med*. 2012 Jul 19;367(3):282-4.
179. Poza-Guedes P, Barrios Y, Fuentes V, Franco A, Sánchez-Machín I, Alonso E, González Pérez R, Infante S, Zapatero L, Matheu V. Downregulation of Angiogenesis Factors, VEGF and PDGF, after Rapid IgE Desensitization and Oral Immunotherapy in Children with Food Allergy. *BioMed Research International* 2014 June; 372567: 8 páginas. Doi:10.1155/2014/372567.
180. Barrios Y, Poza-Guedes P, Sánchez-Machín I, Franco A, Armas H, González R, Matheu V. IP-10 in pediatric celiac disease and food allergy. *American Journal of Gastroenterology* 2014;109:1085-86.
181. Poza-Guedes P, Barrios Y; Gonzalez-Perez R; Sanchez-Machin I; Franco A; Matheu V. Role of specific IgE to β -lactoglobulin in the gastrointestinal phenotype of cow's milk allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol* (en prensa)
182. Ruperto González Perez (2003). Test de Provocación nasal con acetil-salicilato de lisina: nuevo método diagnóstico en la intolerancia a anti-inflamatorios no esteroideos. Universidad de La Laguna, La Laguna (Tenerife, España).

8.- ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento Informado y Hoja informativa a pacientes

Anexo 2: Protocolo de Desensibilización alimentaria del Hospital del Tórax

Anexo 3: Aprobación del Comité de Ética del HUNSC

Anexo 4: Listado de Comunicaciones y Publicaciones extraídas de esta línea de trabajo

ANEXO 1: Hoja informativa y Consentimiento Informado



HOSPITAL DE OFRA-TÓRAX
COMPLEJO HOSPITALARIO NTRA. SRA. DE CANDELARIA

Gobierno de Canarias
Dra. Sánchez Machín
Dr. Matheu Delgado
Dr. González Pérez
Dra. Poza Guedes

Unidad de Gestión de Alergología-Norte

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO para Pruebas de Desensibilización a Alimentos

DATOS DEL PACIENTE

ETIQUETA CON DATOS DEL PACIENTE

Nº Seguridad Social:
Nombre y Apellidos:
Año de Nacimiento:
Domicilio Actual:
Teléfono de Contacto:

PARA QUÉ SIRVE y en QUÉ CONSISTE: Consiste en la toma de cantidades progresivamente mayores de un alimento. A veces es necesario hacer antes una prueba en la piel del brazo, con el alimento que se va a probar. Con esta técnica se intenta lograr que tolere el alimento al que sabemos es alérgico.

CÓMO SE REALIZA: Es una técnica poco molesta. Se puede realizar primeramente una prueba cutánea con determinados alimentos. A continuación, se le da una pequeña cantidad del alimento que se va aumentando cada cierto tiempo, hasta llegar a la cantidad del alimento que usted normalmente tomará, por ejemplo, un vaso de leche. En todo momento estará controlado por un equipo entrenado y con experiencia. Dura normalmente toda la mañana o varias horas, aunque se pueden necesitar días.

QUÉ EFECTOS LE PRODUCIRÁ: Ninguno si no tiene reacción. No obstante, notará los efectos propios de la técnica (escozor o dolor por los pinchazos). A veces durante la prueba aparecen los síntomas alérgicos que usted tuvo (picor, ronchas, pitos en el pecho). Se tratarán hasta que desaparezcan y luego normalmente se continúa.

EN QUÉ LE BENEFICIARÁ: Podrá conseguir tomar el alimento al que era alérgico.

OTRAS ALTERNATIVAS DISPONIBLES EN SU CASO: Depende de cada caso particular: puede continuar evitando el alimento que le produce alergia. En su caso: Anafilaxia.

QUÉ RIESGOS TIENE: Cualquier actuación médica tiene riesgos. La mayor parte de las veces los riesgos no se materializan, y la intervención no produce daños o efectos secundarios indeseables. Pero a veces no es así. Por eso es importante que usted conozca los riesgos que pueden aparecer en este proceso o intervención.

LOS MÁS FRECUENTES: Molestias locales. En el lugar de punción (escozor o picor). Ceden en pocas horas. • Mareo. Suele darse en algunas personas en ciertas situaciones (análisis, visión de sangre, dolor, etc.). Produce sensación de calor, sudor y desvanecimiento. Debe avisarnos si nota estos síntomas. No es grave y desaparece con medicación. No es una reacción alérgica. • Erupciones en la piel. Picores con enrojecimiento de la piel o ronchas es una complicación relativamente frecuente que cede al suspender momentáneamente la prueba y administrarle medicación para ello.

LOS MÁS GRAVES: • En general son problemas poco frecuentes. • Respiratorias. Afonía, pitos en el pecho y sensación de asfixia. Se suspenderá la prueba y le administraremos un tratamiento. • Digestivas. Dolor abdominal, náuseas, vómitos o diarrea. Se suspenderá la prueba y le administraremos un tratamiento. • Muy rara vez. Puede producirse mareo, bajada de tensión, convulsiones e incluso parada cardio-respiratoria. En este caso se tomarán medidas de reanimación. Es grave pero generalmente reversible, aunque de forma excepcional puede provocar la muerte.

OTRAS CUESTIONES PARA LAS QUE LE PEDIMOS SU CONSENTIMIENTO: - A veces, durante la intervención, se producen hallazgos imprevistos. Pueden obligar a tener que modificar la forma de hacer la intervención y utilizar variantes de la misma no contempladas inicialmente.



- A veces es necesario tomar muestras biológicas para estudiar mejor su caso. Pueden ser conservadas y utilizadas posteriormente para realizar investigaciones relacionadas con la enfermedad que usted padece. No se usaran directamente para fines comerciales. Si fueran a ser utilizadas para otros fines distintos se le pediría posteriormente el consentimiento expreso para ello. Si no da su consentimiento para ser utilizadas en investigación, las muestras se destruirán una vez dejen de ser útiles para documentar su caso, según las normas del centro. En cualquier caso, se protegerá adecuadamente la confidencialidad en todo momento. - También puede hacer falta tomar imágenes, como fotos o videos. Sirven para documentar mejor el caso. También pueden usarse para fines docentes de difusión del conocimiento científico. En cualquier caso serán usadas si usted da su autorización. Su identidad siempre será preservada de forma confidencial.

CONSENTIMIENTO

(En el caso del MENOR DE EDAD, cuando se considere que carece de madurez suficiente, el consentimiento lo darán sus representantes legales, aunque el menor siempre será informado de acuerdo a su grado de entendimiento y, si tiene más de 12 años, se escuchará su opinión. Si el paciente está emancipado o tiene 16 años cumplidos será él quien otorgue el consentimiento. Sin embargo, en caso de actuación de grave riesgo, según el criterio del facultativo, los representantes legales también serán informados y su opinión será tenida en cuenta para la decisión.)

Yo, D/Dña , manifiesto que estoy conforme con la intervención que se me ha propuesto. He comprendido las explicaciones, que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo. El facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado. He sido informado sobre posibles alternativas al procedimiento propuesto. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora otorgue. Por ello manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y que comprendo el alcance y los riesgos del procedimiento. Y en tales condiciones:

SI NO Autorizo a que se realicen las actuaciones oportunas, incluyendo modificaciones en la forma de realizar la intervención, para evitar los peligros o daños potenciales para la vida o la salud, que pudieran surgir en el curso de la intervención.

SI NO Autorizo la conservación y utilización posterior de mis muestras biológicas para investigación relacionada directamente con la enfermedad que padezco.

SI NO Autorizo que, en caso de que mis muestras biológicas vayan a ser utilizadas en otras investigaciones diferentes, los investigadores se pongan en contacto conmigo para solicitarme consentimiento.

SI NO Autorizo la utilización de imágenes con fines docentes o de difusión del conocimiento científico.

(NOTA: Márquese con una cruz.)

En (Lugar) , a (fecha)

EL/LA PACIENTE Consentimiento/Visto Bueno de EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

Fdo.:

Fdo.:



RECHAZO DE LA INTERVENCIÓN

Yo, D/Dña. , no autorizo a la realización de esta intervención. Asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida.

En (Lugar) , a (fecha)

EL/LA PACIENTE

Consentimiento/Visto Bueno de EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

Fdo.:

Fdo.:

REVOCACIÓN DE LA INTERVENCIÓN

Yo, D/Dña. , de forma libre y consciente he decidido retirar el consentimiento para esta intervención. Asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida.

En (Lugar) , a (fecha)

EL/LA PACIENTE

Consentimiento/Visto Bueno de EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

Fdo.:

Fdo.:

ANEXO 2: Aceptación del comité de Ética y de Investigación HUNSC



HOSPITAL DE OFRA-TÓRAX
COMPLEJO HOSPITALARIO NTRA. SRA. DE CANDELARIA
Unidad de Gestión de Alergología-Norte



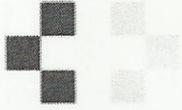
Dr. Juan Navarro Gonzalez, Director de la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario NS Candelaria, CERTIFICA:

*Que el proyecto **"Cinética de citoquinas mediante inmunoensayo múltiple de combinación de la citometría de flujo con la detección por fluorescencia en el seguimiento de pacientes que han sufrido cuadros anafilácticos"** puede realizarse por la Unidad de Alergología-Norte del Hospital de Ofra-Tórax del Complejo Hospitalario Universitario NS Candelaria (CHUNSC) tras la aceptación por parte del Comité de Ética y de Investigación Clínica (CEIC) del CHUNSC y a expensas de conseguir financiación externa.*

Lo que certifico a los efectos oportunos en Santa Cruz de Tenerife a 23 de noviembre de 2011.



Juan F. Navarro-González, MD, PhD
Jefe de Servicio, Unidad de Investigación
Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria
Santa Cruz de Tenerife



25 de junio de 2014

CEIC Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria

Inmaculada Plasencia García
Secretaria del CEIC Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria en su reunión del día 24/06/2014, acta 6/2014 ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

Título: "ESTUDIO COLIVAC: estudio de la validez de la IgE específica in vivo e in vitro en el fenotipaje de la Alergia a Proteínas de la leche de vaca"

Código Promotor: Código Interno: PI-24/14

Promotor:

Investigador principal: VICTOR MANUEL MATHEU DELGADO

Documentos con Versiones:

2º. Considera que:

- Se respetan los principios éticos básicos y es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- Se cumple la legislación aplicable.

3º. Por lo que este CEIC emite un **Aprobado**

Lo que firmo en Santa Cruz de Tenerife, a 25 de junio de 2014

Fdo:

Secretaria del CEIC Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria



ANEXO 3: Protocolo de Desensibilización con leche

INDUCCIÓN DE TOLERANCIA A LECHE DE VACA EN PACIENTES CON ALERGIA MEDIADA POR IgE

PAUTA DE DESENSIBILIZACION ORAL A LECHE DE VACA

Identificación del paciente (iniciales nombre y apellidos):

Nº Historia del Hospital:

Nº de entrada en el estudio:

PRIMER DÍA:

Fecha:

DOSIS	HORA	REACCIÓN
1 ml al 1/100		
2 ml al 1/100		
4 ml al 1/100		
8 ml al 1/100		
16 ml al 1/100		

SEGUNDO DÍA:

Fecha:

DOSIS	HORA	REACCIÓN
1,5 ml al 1/10		
3 ml al 1/10		
6 ml al 1/10		
12 ml al 1/10		
2 ml sin diluir		
4ml sin diluir		

-En el apartado de reacción: si no hay reacción anotar NR.

-Si no puede hacerse en dos días consecutivos, continuar administrando dos veces al día en el domicilio la dosis máxima bien tolerada en el primer día e iniciar con esta dosis la siguiente jornada.

-Con la dosis máxima bien tolerada el segundo día continuar con su administración dos veces al día en el domicilio y citar para continuar con la pauta en una semana.

LECHE SIN DILUIR: AUMENTOS SEMANALES

-Una hora de observación tras la dosis

-Continuará tomando en el domicilio dos veces al día la dosis tolerada en la consulta

-Si no puede acudir una semana, continuará con la dosis tolerada en el domicilio y acudirá cuando pueda para aumentar la dosis

DESENSIBILIZACION EN UNIDAD:

DOSIS	DÍA	REACCIÓN EN DOMICILIO	REACCIÓN EN CONSULTA
4 ml			
8 ml			
15ml			
30 ml			
50 ml			
100 ml			
150 ml			
200 ml			
250ml			

-Si se presenta reacción de urticaria, angioedema, rinoconjuntivitis, broncoespasmo, dolor abdominal o vómitos debe seguir pauta de tratamiento dada.

-Tras su resolución volver a administrar la dosis anterior y tras comprobar su tolerancia, continuar con esta dosis e intentar volver a aumentar en la siguiente semana

-Si por algún motivo se interrumpe su administración durante tres días, informará por teléfono para administrar una toma bajo control en la consulta

RESULTADO DE LA PAUTA DE DESENSIBILIZACION

-Se alcanza la dosis de 200 o 250 ml con buena tolerancia (si /no):

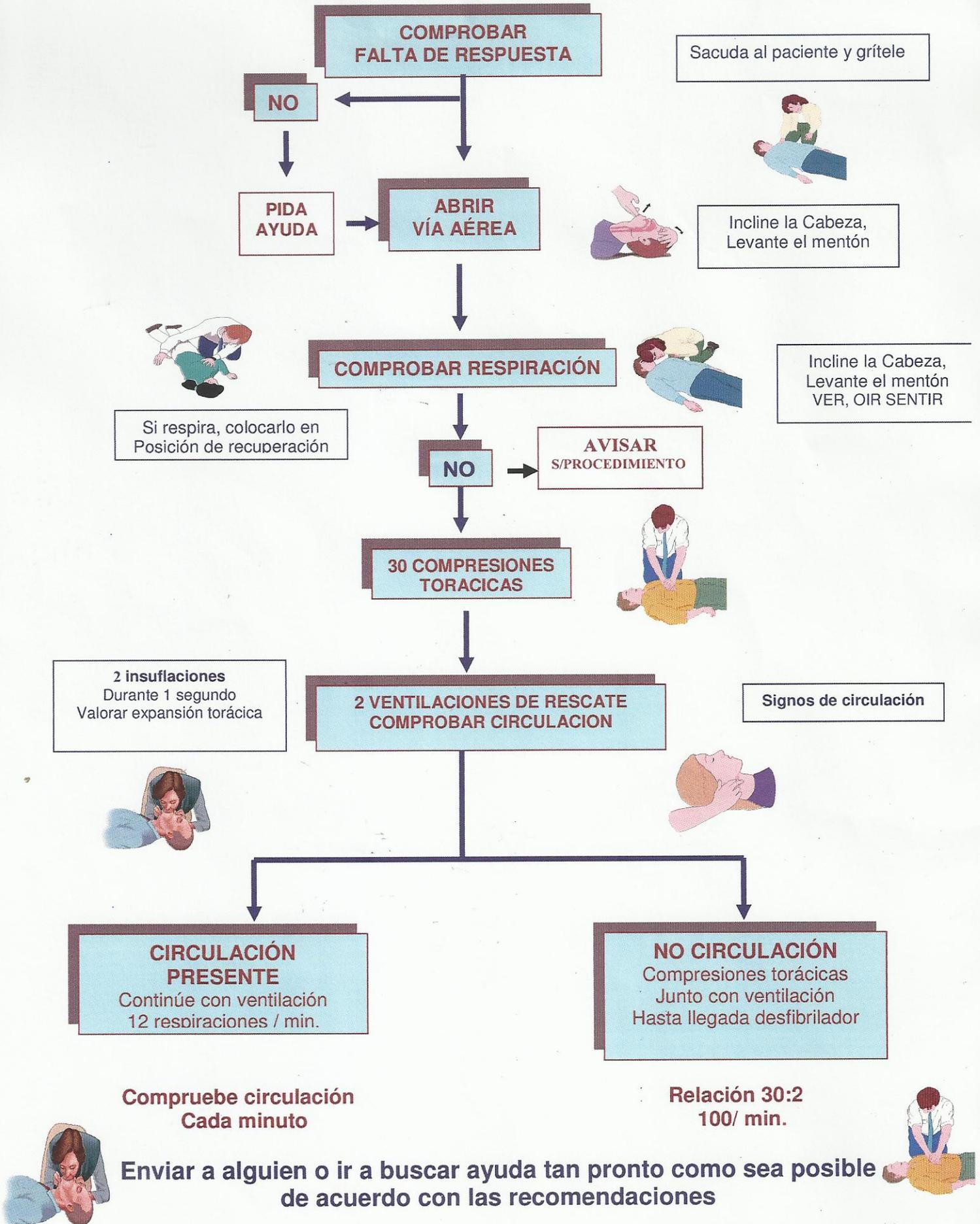
-Si el resultado es negativo

Se alcanza la dosis de ml

Se abandona por mala tolerancia y continua con la dieta de exclusión de leche (si/no):

INCIDENCIAS Y COMENTARIOS:

ALGORITMO DE SOPORTE VITAL BÁSICO



INDUCCIÓN DE TOLERANCIA A LECHE DE VACA EN PACIENTES CON ALERGIA MEDIADA POR IgE
MEDIANTE PAUTA DE DESENSIBILIZACION ORAL.

SEGUIMIENTO (GRUPO ACTIVO)

Identificación del paciente (iniciales nombre y apellidos):

Hospital:

Nº Historia del Hospital:

Nº de entrada en el estudio:

Grupo ACTIVO

TELEFONO DE CONTACTO:

CONTROL POR CONTACTO TELEFONICO

Anotar la fecha de finalización de la pauta de desensibilización:

DOS SEMANAS TRAS FINALIZAR LA DESENSIBILIZACION

Fecha:

Buena tolerancia de la leche de vaca : SI/NO

Incidencias:

SEIS MESES TRAS FINALIZAR LA DESENSIBILIZACION

Fecha:

Buena tolerancia de la leche de vaca : SI/NO

Incidencias:

CONTROL A LOS DOCE MESES de la prueba de provocación doble ciego
--

Fecha:

Buena tolerancia de la leche de vaca: SI/NO

Incidencias:

PRUEBAS CUTANEAS E IgE SERICA ESPECIFICA:

Fecha:	Prick (diámetro mayor/menor)	CAP (KU/l)
Extracto de leche de vaca		
α -lactoalbúmina		
β -lactoglobulina		
Caseina		
Leche de vaca natural: 1/1		
Leche de vaca natural: 1/10		
Leche de vaca natural: 1/100		
Leche de vaca natural: 1/1.000		
Leche de vaca natural: 1/10.000		

IGE TOTAL: UI/ml

HOJA DE INCIDENCIAS

INSTRUCCIONES DURANTE EL PERIODO DE DESENSIBILIZACION

¿Cómo SE PUEDE TOMAR LA LECHE?

La leche de vaca puede tomarla sola o con colacao, nesquick, cereales o kelogs

¿Puede tomar LECHE O QUESO DE CABRA o de OVEJA?

No debe tomar leche, ni queso de cabra o de oveja, mientras no se lo indique su especialista.

¿COMO RELLENAR EL DIARIO DE SEGUIMIENTO?

Anotar la cantidad en ml de leche que se le da para tomar en la cuadrícula “toma de leche en ml”, en el apartado correspondiente según corresponda a “PRIMERA TOMA” o SEGUNDA TOMA DEL DIA”

Si no se lo acaba, medir y anotar lo que se deja en el apartado “ml que se deja”

¿QUE HACER ANTE UNA POSIBLE REACCION?

Si tras la toma de leche presenta

Vómitos:

- Acudirá al día siguiente a la Consulta de Alergia del Hospital para administrar la siguiente toma de leche
- Poner una cruz (X) en el apartado correspondiente del diario

Rojeces o ronchas solo por la cara, alrededor de la boca:

- Administrar: ml de ATARAX jarabe.
- Si se repiten, informar al médico por teléfono.
- Poner una cruz (X) en el apartado correspondiente del diario

Congestión nasal, de ojos, ronchas por el cuerpo o hinchazón de labios o de párpados:

- Administrar: ml de ATARAX jarabe y ml de ESTILSONA
- Acudirá al día siguiente a la Consulta de Alergia del Hospital para administrar la siguiente toma de leche
- Poner una cruz (X) en el apartado correspondiente del diario

SI PRESENTA ALGUNA ENFERMEDAD (GRIPE, AMIGDALITIS, LARINGITIS, OTITIS, BRONQUITIS, GASTROENTERITIS U OTRAS) anotar en el apartado de INCIDENCIAS el día, enfermedad, tratamiento y duración.

¿QUE HACER EN CASO DE DUDA?

Llamar a su médico

NOMBRE Y TELEFONO DE SU MEDICO PARA CONSULTA

INSTRUCCIONES DURANTE EL PERIODO DE SEGUIMIENTO:

¿QUE CANTIDAD DE LECHE DEBE TOMAR CADA DIA?

Debe hacer al menos UNA toma de ml de leche de vaca UNA vez al día, TODOS los días

La leche puede tomarla sola o con colacao, nesquick, cereales

Completar el resto de necesidades de leche diarias con leche o derivados: yogurt u otros preparados lácteos

¿QUÉ HACER SI RECHAZA TOMAR LA CANTIDAD DE LECHE QUE TIENE INDICADA?

Informar al médico por teléfono.

¿QUÉ HACER SI POR ALGUN MOTIVO DEJA DE TOMAR LECHE?

Si pasan DOS días sin tomar leche, informar al médico por teléfono.

¿QUE HACER ANTE UNA POSIBLE REACCION?

Si tras la toma de leche presenta

Vómitos:

- Acudirá al día siguiente a la Consulta de Alergia del Hospital para administrar la siguiente toma de leche

Rojeces o ronchas solo por la cara, alrededor de la boca:

- Administrar: ml de ATARAX jarabe.
- Si se repiten, informar al médico por teléfono.

Congestión nasal, de ojos, ronchas por el cuerpo o hinchazón de labios o de párpados:

- Administrar: ml de ATARAX jarabe y ml de ESTILSONA
- Acudirá al día siguiente a la Consulta de Alergia del Hospital para administrar la siguiente toma de leche

¿QUE HACER EN CASO DE DUDA?

Llamar a su médico

NOMBRE Y TELEFONO DE SU MEDICO PARA CONSULTA

Anexo 4: Listado de Comunicaciones y Publicaciones

A) Listado de Comunicaciones y Publicaciones extraídas de esta tesis

De la elaboración de esta tesis se han extraído las siguientes publicaciones indexadas en la base de datos *Science Citation Index Expanded* y *Web of Science (ISI-Thomson)* y *Google Scholar* valorada por **Thomson Reuters (ISI)** mediante el *Journal Citation Reports®*

1.- Poza P, González R, Barrios Y, Franco A, Matheu V.

“MIP-1 α , MCP-1, and desensitization in anaphylaxis from cow's milk”.

N Engl J Med. 2012 Jul 19;367(3):282-4. doi: 10.1056/NEJMc1200337

Factor de Impacto: 53.486 1º cuartil

2.- Poza-Guedes P, Barrios Y, Fuentes V, Franco A, Sánchez-Machín I, Alonso E, González Pérez R, Infante S, Zapatero L, Matheu V.

“Downregulation of Angiogenesis Factors, VEGF and PDGF, after Rapid IgE Desensitization and Oral Immunotherapy in Children with Food Allergy.”

Biomed Res Int. 2014;2014:372567. doi:10.1155/2014/372567.

Factor de Impacto: 01.579 3º cuartil

3.- Barrios Y, Poza-Guedes P, Sánchez-Machín I, Franco A, Armas H, González R, Matheu V.

“IP-10 in pediatric celiac disease and food allergy”.

Am J Gastroenterol 2014;109:1085-86. doi: 10.1038/ajg.2014.127

Factor de Impacto: 10.755 1º cuartil

4.- Poza-Guedes P, Barrios Y, González-Pérez R, Sánchez-Machin I, Franco A, Matheu Delgado V.

"Role of specific IgE to β -lactoglobulin in the gastrointestinal phenotype of cow's milk allergy"

Allergy Asthma Clin Immunol (en prensa)

Factor de Impacto: 02.030 2º cuartil

5.-Poza-Guedes P, González-Pérez R, Sánchez-Machín I, Matheu V.

"Long-term follow-up in cow's milk anaphylaxis after successful rush immunotherapy".

J Allergy Clin Immunol 2014; 133 (2):106.

Factor de Impacto: 11.476 1º cuartil

6.- Poza-Guedes P, González-Pérez R, Sánchez-Machín I, Matheu V.

"Oral Cow's Milk Immunotherapy: Relevant Cofactors during Long-Term Follow-up"

J Allergy Clin Immunol 2015; 135 (2):257.

Factor de Impacto: 11.476 1º cuartil

7.- Matheu V, Poza-Guedes P, Gonzalez R, Sánchez I.

"Gastrointestinal Phenotype of Cow's Milk Food Allergy: Prevalence"

J Allergy Clin Immunol 2015; 135 (2):253.

Factor de Impacto: 11.476 1º cuartil

8.- Poza-Guedes P, González-Pérez R, Sánchez-Machín I, Matheu V.

"Real-Life Follow-up in Cows Milk Immunotherapy: Clinical and Serological Data"

J Allergy Clin Immunol 2016; remitido

Factor de Impacto: 11.476 1º cuartil

9.- Matheu V, Poza-Guedes P, Sánchez I, Barrios Y, Franco A, González R.
“IgE casein/IgE B-lactoglobulin in gastrointestinal phenotype of cow’s milk allergy”

J Allergy Clin Immunol 2016; remitido

Factor de Impacto: 11.476 1º cuartil

10.- Poza Guedes P, González Pérez R, Sánchez Machín I, Matheu V.
“Oral Cow’s milk Immunotherapy: clinical & serological data in Long-Term Follow up”

Allergy 2010; 65 (Suppl. 92): 370-371.

Factor de Impacto: 06.297 1º cuartil

11.- Poza Guedes P, González Pérez R, Sánchez Machín I, Matheu V.
“Oral cow’s milk immunotherapy: clinical and serological data in long-term follow up”

Clin & Trans Allergy 2015;5(Suppl 3):158.

B) Durante la realización de esta Tesis Doctoral he participado en otros diferentes proyectos que han dado lugar a las siguientes publicaciones:

1.- González-Pérez R, **Poza-Guedes P**, Matheu V, Sánchez-Machín I.

“Oral mite ingestion: expect more than anaphylaxis”.

J Allergy Clin Immunol 2013 Aug; 132 (2): 505-6

IF: 12,047

- 2.- Matheu V, González-Pérez R, **Poza P**, Sánchez-Machín I.
“Desensitization against Clinical Tolerance”.
*Med Clin (Barc)*2013 (Jan 19): IF: 3,486
- 3.- J Iglesias-Souto, R González , **P Poza-Guedes**, I Sánchez, V Matheu,
“Evaluating the Utility of Retesting for β -lactam Allergy in Children”.
Pediatr Infect Dis J. 2012 Jun 5. IF: 3,064
- 4.- J Iglesias-Souto, R González, **P Poza-Guedes**, I Sanchez, V Matheu,
“Accuracy in diagnosis of allergy to β -lactams”.
Crit Care. 2012 Mar 9;16(2):414 IF: 4,600
- 5.- I Sánchez, R González, **P Poza**, J Iglesias-Souto, V Iraola, V Matheu.
“Asthma and Rhinitis by storage mites”.
Allergy. 2011 Dec;66(12):1615-6. IF: 6,297
- 6.- V Matheu, J Iglesias-Souto, **P Poza-Guedes**, R González, I Sánchez.
“Retest in betalactam allergy in children”.
J Allergy Clin Immunol 2011 2011 Aug;128(2):429; IF: 9,273
- 7.- I Sánchez-Machín, R González, **P Poza**, J Iglesias, V Iraola, V Matheu.
“Oral mite anaphylaxis”.
Allergy 2010: 65(10):1345-7. IF: 6.297
- 8.- J Iglesias-Souto, I Sánchez, V Iraola, **P Poza**, R González, V Matheu
“Oral mite anaphylaxis by *Thyreophagus entomophagus* in a child: a case report.”
Clinical Mol Allergy 2009, 7:10
- 9.- Matheu V, Pérez E, González R, **Poza P**, García-Robaina J.
“Assessment of a new brand of determinants for skin test in a large group of patients with a suspect of beta-lactam allergy”.
J Invest Allergol Clin Immunol 2007; 17(4): 257-260 IF:1,254

could not find studies on the relationship between a physics requirement and aspects of performance in medical school or medical practice. However, the justification for a background in chemistry or physics is the same as it is for one in the behavioral and social sciences — it allows professors to move directly into more advanced topics. Given the conceptual breadth and strong clinical relevance of the behavioral and social sciences, it seems unrealistic to expect medical schools to adequately train students when many schools are unable to address advanced topics because their curriculum time must be used to remediate poor preparation by some students.

Although we appreciate Dienstag's perspective, we remain convinced that solid preparatory training and evaluation in the behavioral and social sciences is essential for training tomorrow's physicians.

Robert M. Kaplan, Ph.D.
National Institutes of Health
Bethesda, MD
robert.kaplan@nih.gov

Jason M. Satterfield, Ph.D.
University of California
San Francisco, CA

Raynard S. Kington, M.D., Ph.D.
Grinnell College
Grinnell, IA

The views expressed in this letter are those of the authors and do not necessarily represent those of the National Institutes of Health.

Since publication of their article, the authors report no further potential conflict of interest.

1. Astin JA, Soeken K, Sierpina VS, Clarridge BR. Barriers to the integration of psychosocial factors in medicine: results of a national survey of physicians. *J Am Board Fam Med* 2006;19:557-65.
2. Institute of Medicine. Improving medical education: enhancing the social and behavioral science content of medical school curricula. Washington, DC: National Academy Press, 2004.
3. Callahan CA, Hojat M, Veloski J, Erdmann JB, Gonnella JS. The predictive validity of three versions of the MCAT in relation to performance in medical school, residency, and licensing examinations: a longitudinal study of 36 classes of Jefferson Medical College. *Acad Med* 2010;85:980-7.
4. Dixon D. Prediction of osteopathic medical school performance on the basis of MCAT score, GPA, sex, undergraduate major, and undergraduate institution. *J Am Osteopath Assoc* 2012;112:175-81.

DOI: 10.1056/NEJMc1206331

MIP-1 α , MCP-1, and Desensitization in Anaphylaxis from Cow's Milk

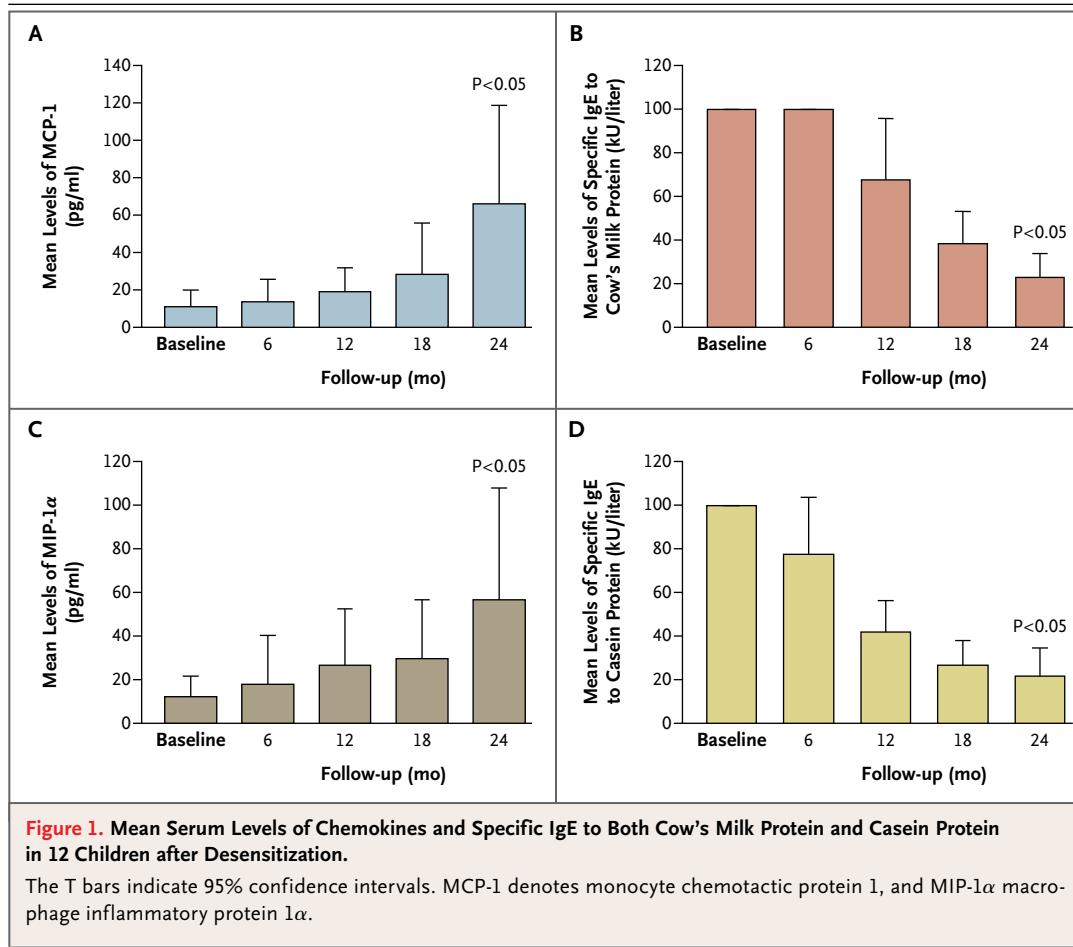
TO THE EDITOR: Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), also known as chemokine (C-C motif) ligand 2, has chemotactic activity for monocytes and basophils and causes the degranulation of basophils and mast cells.¹ Another chemokine, macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α), also called chemokine (C-C motif) ligand 3, is produced by macrophages, dendritic cells, and lymphocytes.² We have observed that 12 children with an allergy to cow's milk protein,³ the most prevalent food allergy in children, have significantly lower levels of MCP-1 (mean, 11.1 pg per milliliter) and MIP-1 α (12.1 pg per milliliter) than children with atopy who do not have this allergy (MCP-1, 28.4 pg per milliliter; and MIP-1 α , 29.8 pg per milliliter).

Before desensitization was performed, oral and written informed consent was obtained from all patients or from their parent or guardian. Compilation of the data was recorded in accordance with European standards of data protection, and the study was approved by the clinical research ethics committee of the Hospital Universitario N.S. Candelaria. The study pro-

ocol is available with the full text of this letter at NEJM.org.

Twelve children (10 boys and 2 girls) who were 2 to 15 years of age (median, 6 years) with persistent allergy to cow's milk protein, severe recurrent episodes of grade 2 or 3 anaphylaxis, and multiple visits to the emergency department after accidental ingestion of cow's milk protein despite an appropriate restrictive diet underwent a 2-day rapid protocol of desensitization in the pediatric critical care unit of Hospital Universitario N.S. Candelaria. All patients had positive skin-prick tests and specific IgE antibodies to cow's milk protein (mean serum level of specific IgE to cow's milk protein, >100 kU per liter; mean serum level of specific IgE to casein protein, >100 kU per liter).

Thereafter, a second phase was scheduled in the outpatient clinic for the children to receive increasing doses of undiluted milk for a 6-week period. The goal was for the children to be able to consume 250 ml every 12 hours after this 6-week period. In less than 10 weeks, all 12 children were able to consume 250 ml of milk.



After 2 years, all the children still consumed a glass of milk every day, and their MCP-1 and MIP-1α levels measured by means of flow cytometry (Fig. 1A and 1C) were significantly higher than those in children with persistent allergy to cow's milk protein ($P < 0.05$ by the Mann-Whitney U test). However, there were no significant changes in serum levels of serum cytokines such as interleukins 2, 4, 5, 6, 8, 10, 13, and 17; interferon- γ ; eotaxin; RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted); and tumor necrosis factor α .

Although allergy to cow's milk protein resolves in 70% of affected children by 3 years of age, its presence still leads to some deaths, life-threatening anaphylaxis, and many concerns in parents and guardians. With the therapeutic intervention described here, children with suspected allergy to cow's milk protein and anaphylaxis appeared to have less stress⁴ and to be able to enjoy an unrestricted diet.

Elevated levels of MCP-1 and MIP-1α could re-

flect an ongoing subclinical response to food substances and to mast-cell degranulation and differential inflammatory-cell recruitment in response to the antigen-specific continuous challenge. We speculate that measurements of levels of MCP-1² and MIP-1α⁵ might be useful as markers of a successful protocol for milk protein desensitization.

Paloma Poza-R. Glez, M.D., Ph.D.

Hospital del Tórax
Tenerife, Spain

Yvelise Barrios-A. Franco, M.D.

Hospital Universitario de Canarias
Tenerife, Spain

Víctor Matheu, M.D., Ph.D.

Hospital Universitario N.S. Candelaria
Tenerife, Spain
victor.matheu@gmail.com

Supported by the Unidad de Gestión Alergología-Norte, Hospital del Tórax; and by the Foundation of the Spanish Society of Allergy and Clinical Immunology.

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this letter at nejm.org.

- Conti P, Boucher W, Letourneau R, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 provokes mast cell aggregation and [3H]5HT release. *Immunology* 1995;86:434-40.
- Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-Int J Biochem Cell Biol 2004;36:1882-6.
- Zeiger RS. Food allergen avoidance in the prevention of food allergy in infants and children. *Pediatrics* 2003;111:1662-71.
- Bollinger ME, Dahlquist LM, Mudd K, Sonntag C, Dillinger L, McKenna K. The impact of food allergy on the daily activities of children and their families. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96:415-21.
- Frishmeyer-Guerrero PA, Guerrero AL, Chichester KL, et al. Dendritic cell and T cell responses in children with food allergy. *Clin Exp Allergy* 2011;41:61-71.

DOI: 10.1056/NEJMc1200337

Correspondence Copyright © 2012 Massachusetts Medical Society.

INSTRUCTIONS FOR LETTERS TO THE EDITOR

Letters to the Editor are considered for publication, subject to editing and abridgment, provided they do not contain material that has been submitted or published elsewhere. Please note the following:

- Letters in reference to a *Journal* article must not exceed 175 words (excluding references) and must be received within 3 weeks after publication of the article.
- Letters not related to a *Journal* article must not exceed 400 words.
- A letter can have no more than five references and one figure or table.
- A letter can be signed by no more than three authors.
- Financial associations or other possible conflicts of interest must be disclosed. Disclosures will be published with the letters. (For authors of *Journal* articles who are responding to letters, we will only publish new relevant relationships that have developed since publication of the article.)
- Include your full mailing address, telephone number, fax number, and e-mail address with your letter.
- All letters must be submitted at authors.NEJM.org.

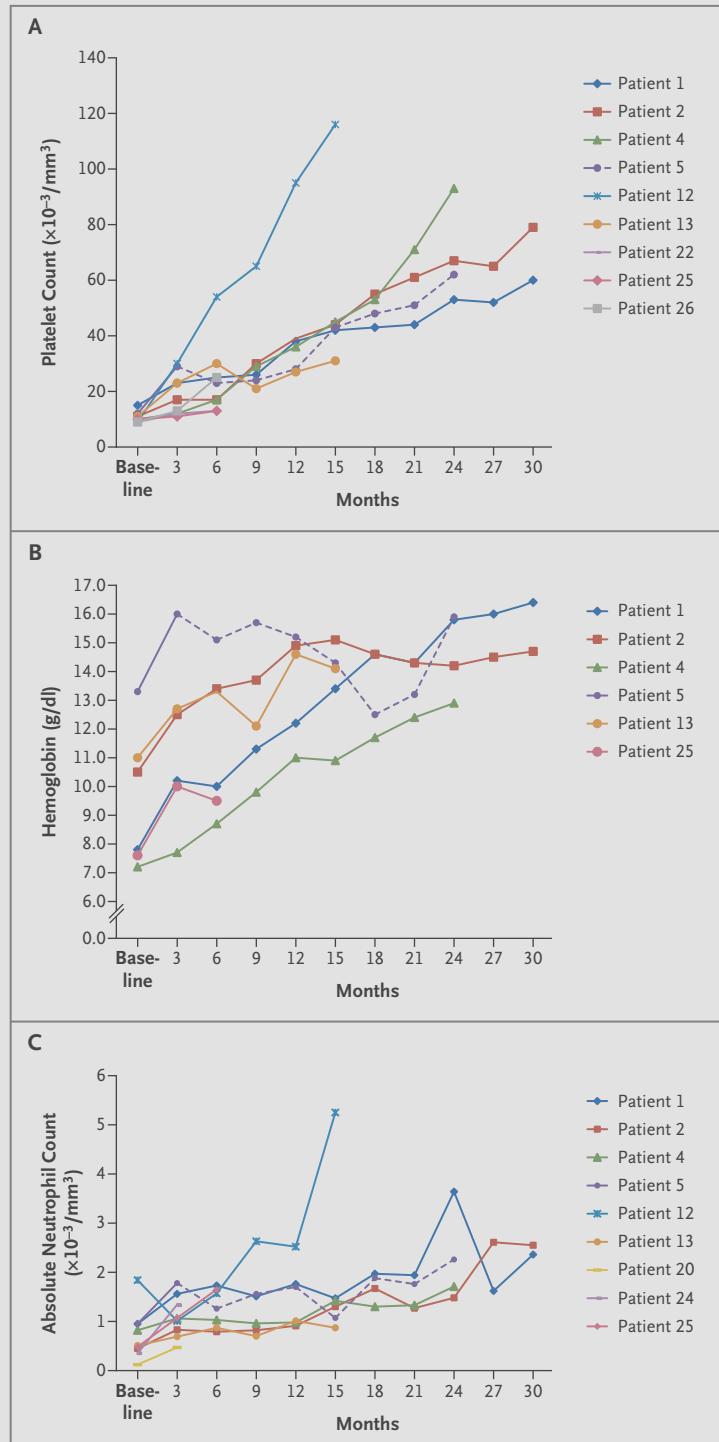
Letters that do not adhere to these instructions will not be considered. We will notify you when we have made a decision about possible publication. Letters regarding a recent *Journal* article may be shared with the authors of that article. We are unable to provide prepublication proofs. Submission of a letter constitutes permission for the Massachusetts Medical Society, its licensees, and its assignees to use it in the *Journal's* various print and electronic publications and in collections, revisions, and any other form or medium.

Figure 2. Longitudinal Hematologic Improvements in Patients Who Received Eltrombopag.

Longitudinal blood counts for all 11 patients who met response criteria in one or more lineages at 12 weeks are shown. Panel A shows platelet counts in the 9 patients who met the criteria for a platelet response at 12 weeks or later. Panel B shows hemoglobin responses in 6 patients who met the criteria for a hemoglobin response at 12 weeks or later. Panel C shows neutrophil responses in 9 patients who met the criteria for a neutrophil response at 12 weeks or later. The dashed portion of the line for Patient 5 indicates the time after which eltrombopag was discontinued because of putative cataract formation. This patient received monthly therapeutic phlebotomy to treat iron overload between months 6 and 18.

CORRECTIONS

Eltrombopag and Improved Hematopoiesis in Refractory Aplastic Anemia (July 5, 2012;367:11-9). Because of a printer's error, Figure 2 (page 17) was rendered incorrectly in the print issue. The figure is reprinted correctly here. We regret the error. The article is correct at NEJM.org.



**MIP-1 α , MCP-1, and Desensitization in
Anaphylaxis from Cow's Milk**

Citation as "*Glez PP-R, Franco YB-A, Matheu V. MIP-1 α , MCP-1, and desensitization in anaphylaxis from cow's. N Engl J Med 2012; 367:282-284*".

N Engl J Med 2012;367:282-4.

DOI: 10.1056/NEJMc1200337

July 19, 2012

Supplement available with the full text of this letter
at NEJM.org

Supplementary material

This supplement contains the following items

- 1) A copy of the final protocol (English),**
- 2) A copy of the study's initial protocol & summary of amendments to the protocol (English),**
- 3) A copy of the original & final statistical analysis plan & a summary of amendments to statistical analysis plan (original in Spanish),**
- 4) The Research Unit Approval of Complejo Hospital Universitario NS Candelaria (original in Spanish)**
- 5) The Ethics Committee Approval by Complejo Hospital Universitario NS Candelaria (original in Spanish)**
- 6) Application for the grant of partial financial support of analysis to Spanish Society of Allergy and Clinical Immunology (SEAIC) (original in Spanish)**

Document 1 Copy of the final protocol

Copy of the final Desensitization protocol of Cow's Milk

The desensitization for each patient was conducted in the Paediatric critical care unit (PCCU) according to the safety guidelines established at the Hospital. The procedure was explained to parents and children and an informed consent regarding the potential risks and benefits was signed by parents or tutors.

Children were admitted in PCCU at 8.00 a.m. at Day 1 (Monday) and were supported by parents/tutors at all time. The procedure was again explained and a baseline monitoring in medical setting was established. A secure intravenous route was taken on patient by nurse and rescue medications, including epinephrine, antihistamines, bronchodilators, and supplemental oxygen, were placed by the bedside to warrant a rapid administration.

One ml of fresh whole milk was diluted in 99 ml mineral water to get the proper dilution at 1:100 (v/v). We started the procedure offering orally 1ml of the dilution and it was ingested by the child. Every 30 minutes, double volume (2, 4 and 8 ml) of the same dilution were offered.

When a mild systemic reaction appeared, the same dose was repeated. When a moderate systemic reaction appeared, proper medication was given and after 30 minutes the same dose was repeated. After a child tolerated 8 ml, another fresh dilution was prepared by adding 1 ml of whole milk in 9 ml of mineral water (1:10 (v/v)). We offered 1 ml of 1:10 dilution. The procedure finished at Day 1 when child had no reactions and tolerated 2 ml of 1:10 dilution.

Child and parents were discharged 1 hour after last volume with the intravenous via (protected and with heparin) and slept at home. A 2 ml of the same 1/10 diluted milk was given Copy of the final Desensitization protocol of Cow's Milk

The desensitization for each patient was conducted in the Paediatric critical care unit (PCCU) according to the safety guidelines established at the Hospital. The procedure was explained to parents and children and an informed consent regarding the potential risks and benefits was signed by parents or tutors.

Children were admitted in PCCU at 8.00 a.m. at Day 1 (Monday) and were supported by parents/tutors at all time. The procedure was again explained and a

baseline monitoring in medical setting was established. A secure intravenous route was taken on patient by nurse and rescue medications, including epinephrine, antihistamines, bronchodilators, and supplemental oxygen, were placed by the bedside to warrant a rapid administration.

One ml of fresh whole milk was diluted in 99 ml mineral water to get the proper dilution at 1:100 (v/v). We started the procedure offering orally 1ml of the dilution and it was ingested by the child. Every 30 minutes, double volume (2, 4 and 8 ml) of the same dilution were offered.

When a mild systemic reaction appeared, the same dose was repeated. When a moderate systemic reaction appeared, proper medication was given and after 30 minutes the same dose was repeated. After a child tolerated 8 ml, another fresh dilution was prepared by adding 1 ml of whole milk in 9 ml of mineral water (1:10 (v/v)). We offered 1 ml of 1:10 dilution. The procedure finished at Day 1 when child had no reactions and tolerated 2 ml of 1:10 dilution.

Child and parents were discharged 1 hour after last volume with the intravenous via (protected and with heparin) and slept at home. A 2 ml of the same 1/10 diluted milk was given to parents and offered to children at home at 8.00 p.m. Medical Staff was permanently connected with parents/tutors during that day.

Children were again admitted in PCCU at 8.00 a.m. at Day 2 (Tuesday) and the procedure was again explained to parents and children. We followed exactly the same method as the day before. A new fresh dilution (1:10 (v/v)) was prepared, and a dose of 2 ml was ingested by the child. Every 30 minutes, double volume (4 and 8 ml) of the same dilution were offered. Next, 1, 2 and 4 ml of whole milk were offered to every child with an interval between them of 30 minutes. Day 2 was finished in PCCU 60 minutes after the child tolerated 4 ml of whole fresh milk. That Day 2, child took 4 ml of whole milk at home.

Subsequent days, child took 4 ml of whole milk at home every 12 hours (at 8:00 a.m. and a 8:00 p.m.) during the entire week. Parents were educated regarding the early symptoms and to treat anaphylaxis with the epinephrine auto injector and antihistamines at home. They also had permanent contact by phone with Staff to attend to E.R. in case of necessary. Every next Monday, a double amount of milk was given in the Outpatient Allergy Office with a specific Staff (MD and RN) in one-to-one attendance. The 6-week schedule is shown below.

Phase I				
Day	Cow milk dilution	Amount in ml	Place	Interval
1	1/100	1	Paediatric Critical Care Unit	30 min
		2		
		4		
		8		
	1/10	1		
		2		
2	1/10	2	P.C.C.U.	30 min
		4		
		8		
	1/1	1		
		2		
		4		

Phase II				
Week	Cow milk dilution	Amount in ml	Location of 1 st dose	Interval dosing at home
0	Undiluted	4	P.C.C.U.	Every 12 h
1		8	Outpatient Office	
2		16		
3		32		
4		64		
5		125		
6	250			

Document 2 Copy of the study's initial protocol of Desensitization of Cow's Milk

The desensitization for each patient should be conducted in the Paediatric critical care unit (PCCU) according to the safety guidelines established at the Hospital. The procedure should be explained to parents and children and an informed consent regarding the potential risks and benefits should be signed by parents or tutors.

Children will be admitted in PCCU at 8.00 a.m. at Day 1 (Monday) and should be supported by parents/tutors at all time. The procedure should be again explained and a baseline monitoring in medical setting will be established. A secure intravenous route should be taken on patient by nurse and rescue medications, including epinephrine, antihistamines, bronchodilators, and supplemental oxygen, will be placed by the bedside to warrant a rapid administration

1st Day DOSES	HOUR	REACTION
1 ml 1/100		
2 ml 1/100		
4 ml 1/100		
8 ml 1/100		
1.6 ml 1/10		

2nd Day: DOSES	HOUR	REACTION
1.6 ml 1/10		
3.2 ml 1/10		
6 ml 1/10		
12 ml 1/100		
2.5 ml UNDILUTED		

3rd Day weekly increases DOSES	DAY	REACTION	REACTION
4			
6			
8			
12			
15			
20			
25			
30			
40			
50			
75			
100			
125			
150			
200			

Document 3 A copy of the original statistical analysis plan, the final statistical analysis plan & a summary of amendments to statistical analysis plan (original in Spanish)

Metodología y plan de trabajo

Se reclutarán sueros de pacientes (casos) con hipersensibilidad demostrada (mediante historia clínica compatible y pruebas cutáneas y/o IgE específica y cuando proceda provocación controlada) frente a diversos alimentos durante el primer semestre del año 2012. Los participantes o sus tutores firmarán un consentimiento específico. El estudio ha sido presentado para su aprobación por el Comité de Ética

e Investigación Clínica (CEIC) del Hospital. Se procederá a la extracción de sangre periférica mediante veno-punción en el momento del diagnóstico. Se procederá a congelación a -80°C. De modo similar se obtendrán suero en un punto intermedio y uno final para la determinación de citoquinas (IL-1 alfa, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IP-10, MCP- -1, MCP-3, Eotaxina, RANTES, TNF-alfa, TGF-beta, GM-CSF) mediante sistema de la combinación de la citometría de flujo con la detección por fluorescencia, mediante el inmunoensayo de formato «Multiplex: Multiplexed immunobead-based profiling markers», que permite determinar simultáneamente diferentes parámetros con mayor sensibilidad en una cantidad pequeña de muestra y en las mismas condiciones.

Document 4 The Research Unit Approval of Complejo Hospital Universitario NS Candelaria (original in Spanish)



Dr. Juan Navarro Gonzalez, Director de la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario NS Candelaria, CERTIFICA:

Que el proyecto "Cinética de citoquinas mediante inmunoensayo múltiple de combinación de la citometría de flujo con la detección por fluorescencia en el seguimiento de pacientes que han sufrido cuadros anafilácticos" puede realizarse por la Unidad de Alergología-Norte del Hospital de Ofra-Tórax del Complejo Hospitalario Universitario NS Candelaria (CHUNSC) tras la aceptación por parte del Comité de Ética y de Investigación Clínica (CEIC) del CHUNSC y a expensas de conseguir financiación externa.

Lo que certifico a los efectos oportunos en Santa Cruz de Tenerife a 23 de noviembre de 2011.

Juan Navarro


Juan F. Navarro-González, MD, PhD
 Jefe de Servicio, Unidad de Investigación
 Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria
 Santa Cruz de Tenerife

Document 5 The Ethics Committee Approval by Complejo Hospital Universitario NS Candelaria (original in Spanish)

Informe Dictamen Protocolo Favorable
 Otros Estudios
 C.F. - C.I. P9/35/11
 02 de diciembre de 2011

CEIC Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria

JAVIER MERINO ALONSO
 Vicepresidente del CEIC Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria en su reunión del día 22/11/2011, acta 10/11 ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

Título: "Cinéticas de citoquinas mediante inmunoensayo múltiple de combinación de la citometría de flujo con la detección por fluorescencia en el seguimiento de pacientes que han sufrido cuadros anafilácticos"

Código Interno: P1-35/11
 Investigador principal: Dr. Victor Matheu Delgado

1º. Considera que

- Se respetan los principios éticos básicos y es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado

2º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE**

Lo que firmo en Santa Cruz de Tenerife, a 02 de diciembre de 2011

Vicepresidente del CEIC Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria

Javier Merino Alonso


Fdo: JAVIER MERINO ALONSO

Complejo Hospitalario Nuestra Señora de Candelaria - Ofra
 C/ta. Del Rosario, 145 3ª planta - Santa Cruz de Tenerife - 38500 - Tenerife, S.C. - España

Página 1 de 1

Protocol

This trial protocol has been provided by the authors to give readers additional information about their work. Protocol for: Glez PP-R, Franco YB-A, Matheu V. MIP-1α, MCP-1, and desensitization in anaphylaxis from cow's milk. N Engl J Med 2012;367:282-4. DOI: 10.1056/NEJMc1200337

Clinical Study

Downregulation of Angiogenesis Factors, VEGF and PDGF, after Rapid IgE Desensitization and Oral Immunotherapy in Children with Food Allergy

Paloma Poza-Guedes,¹ Yvelise Barrios,² Victoria Fuentes,³ Andres Franco,²
Inmaculada Sánchez-Machín,¹ Elena Alonso,³ Ruperto González Pérez,¹ Sonsoles Infante,³
Lydia Zapatero,³ and Víctor Matheu^{1,4}

¹ *Consulta de Alergia Infantil, Unidad de Alergología-Norte, Hospital del Tórax/Ofra, CHUNSC, Ofra, Spain*

² *Immunology, Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Spain*

³ *Consulta de Alergia Infantil, Hospital Infantil Gregorio Marañón, Madrid, Spain*

⁴ *Department of Clinical Sciences-Division IV, Lund University, Sweden*

Correspondence should be addressed to Víctor Matheu; victor.matheu@med.lu.se

Received 16 February 2014; Revised 6 April 2014; Accepted 29 April 2014; Published 3 June 2014

Academic Editor: Brian Oliver

Copyright © 2014 Paloma Poza-Guedes et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Angiogenesis has a key role in several conditions and is regulated by several factors such as the platelet-derived growth factor (PDGF) or the vascular endothelial growth factor (VEGF). The goal of this study was to investigate the possible role of PDGF and VEGF in a group of patients with severe food allergy. **Methods.** We design a prospective longitudinal study ($n = 30$) with patients with persistent cow's milk proteins (CMP) allergy. After achieving a CMP rush desensitization protocol, a clinical followup including SPT and blood samples to determine sIgE, protein levels, PDGF, and VEGF-A and a panel of the most representative Th₁, Th₂, T_{reg}, and Th₁₇ cytokines were also monitored. **Results.** Baseline levels of PDGF and VEGF in the CMP allergic patients (1170 pg/mL and 253 pg/mL) were different compared to those nonallergic CMP control subjects (501 pg/mL and 108 pg/mL). Both PDGF and VEGF were significantly downregulated ($P < 0.05$) 6 months after completion of the CMP desensitization process and remained significantly decreased 12 months later. **Conclusion.** The present study shows a significant increase of PDGF and VEGF in anaphylaxis suffering children compared to a control group. Interestingly, both VEGF and PDGF were significantly downregulated after completing a full CMP rush IgE desensitization.

1. Introduction

Food allergy is a growing problem in developed countries and a recent meta-analysis in US patients found an increase of almost 20% in the current prevalence of food allergy over the past decade [1]. Although food allergy patients are generally expected to outgrow their condition, it may take longer than previously believed [2]. Regrettably, despite strict dietary avoidance, food allergy still continues to be the leading cause of anaphylaxis [3] among the pediatric patients with a profound impairment in their quality of life [4]. These are only some of the encouraging reasons that lead an increasing number of investigators to develop novel

therapeutic approaches (i.e., food desensitization and/or food immunotherapy) to a better management of this health condition.

Angiogenesis, the blood vessel formation from already-existing blood vessel tissue, is regulated by several factors which have received an increasing interest because of their role in tumor growth and metastatic spread. One of the factors, the platelet-derived growth factor (PDGF), has been linked to several diseases such as malignant diseases and atherosclerosis or fibrosis [5]. PDGF is synthesized and released by platelets upon activation and smooth muscle or endothelial cells. PDGF can also be released by activated

macrophages [6]. A different angiogenic factor, the vascular endothelial growth factor (VEGF), is described as the most potent proangiogenic factor regulating endothelial cells, increasing vascular permeability, promoting cell migration, and inhibiting apoptosis [7]. VEGF has been identified as an important target of cancer therapy [8]. The block of endothelial cell VEGF activity inhibits tumor angiogenesis, normalizes tumor vasculature, facilitates improved chemotherapy delivery, and prevents the recruitment of progenitor cells from the bone marrow [8].

However, vascular remodeling is associated with increased vascular permeability; it is also a key feature in the pathogenesis of many chronic inflammatory diseases [9] including lung disorders [10] such as asthma [11, 12]. It has been also shown to have an essential role of nitric oxide in VEGF-induced, asthma-like angiogenic, physiologic responses in the lung and some features of phenotype as mucus [10], and it is even linked with atopic dermatitis [13]. In addition, *in vitro* studies have also proved that IgE could induce the VEGF production in mast cell lines [14].

The goal of this study was to investigate the role of a panel of the most representative cytokines of the Th₁, Th₂, T_{reg}, and Th₁₇ and the angiogenic factors PDGF and VEGF in a group of patients with severe allergy—that is, anaphylaxis—after the ingestion of cow's milk protein (CMP), the most prevalent food allergy in the early years of life. In addition, we have monitored the variation in these factors before and after the fulfillment of a standardized clinical intervention (i.e., CMP rush desensitization) with a marked clinical outcome in the course of the persistent disease.

2. Methods

2.1. Study Design and Population. We design a prospective longitudinal series study of 30 pediatric patients with a diagnosis of persistent cow's milk proteins (CMP) severe allergy. All children included in the active study group complained with anaphylaxis episodes [15] after the ingestion of CMP and frequent nonscheduled visits to the Emergency Room (ER), despite a correct CMP restrictive diet. These patients have positive skin prick tests and high levels of specific IgE (sIgE) antibodies to CMP, with a distinct immunological phenotype showing low levels of the granule neutral proteases such as monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α), as previous described [15, 16]. A matched group of 30 pediatric patients with no food allergy and no dietary restrictions fulfilled the control group. The informed consent was obtained from parents or guardians and the CMP protocol has been previously approved by the Hospital Ethics Committee (PI CHUNSC: 35/11).

2.2. Clinical Intervention. Those patients with CMP anaphylaxis underwent a two-step standardized protocol starting with a rapid CMP desensitization at the Pediatric Critical Care Unit and followed by a subsequent oral CMP immunotherapy treatment (OIT) at the Allergy Office to achieve tolerance to the CMP contained in a glass of milk (250 mL) in 6 weeks as described elsewhere [15]. Allergic

patients and their tutors were trained and fostered to recognize and treat the early symptoms of allergic reactions (oral antihistamines or corticosteroids), including anaphylaxis [17] with epinephrine autoinjector device, while kept in permanent telephone contact with the ER medical staff.

2.3. Serum Sample Collection and Measurement of Protein and Factors. A clinical followup including sIgE and blood samples for the measurement of protein levels was collected and monitored at different timelines (baseline and 6 and 12 months) for every patient. After venopuncture, serum was obtained after centrifugation and stored at -80°C until the assay experiment was completed. All *in vitro* experiments were done at the same assay to avoid any *in-house* differences. Specific IgE antibodies against CMP, casein, α -lactalbumin, and β -lactoglobulin were determined by using enzyme immunoassay (Phadia, Uppsala, Sweden). Along with PDGF and VEGF-A, a panel of the most representative cytokines of the Th₁, Th₂, T_{reg}, and Th₁₇ response was determined in plates by using a designed immunoassay analysis. Very briefly, the wells in the plate were soaked and a diluted capture bead solution was added. Then it was vortex and sonicated. Then, after washes, an incubation buffer was added to every well and standards were added into designated wells. Samples were added with assay diluents. The plate was then covered and incubated for 2 hours at room temperature on a shaker. Then, after washes, the prepared biotinylated detector antibody diluting in biotin diluents was added to every well. The plate was covered and incubated for 1 hour on a shaker. After new washes, diluted Streptavidin-RPE was added to each assay well. Plate was covered and incubated for 30 minutes on a shaker. Finally, after washing, standards were added into wells and plate was covered and incubated the plate for 2 hours at room temperature on a shaker. The plate was read on any immunofluorescence reader.

2.4. Statistical Analysis. Statistical analysis was performed by application of Mann-Whitney *U* test using StatView software. The differences were considered significant when *P* was equal or less than 0.05 $P < 0.05$.

3. Results

The active study group included 30 children (24:6 male:female ratio; 2–15 y.o.: median 7 y.o.) with a clinical diagnosis of persistent CMP allergy expressed as severe recurrent grade II/III anaphylactic episodes [15]. The diagnostic workout showed positive skin prick tests and very high levels of sIgE antibodies to whole CMP (average sIgE to CMP 189 kU/l) and casein protein (178 kU/l) (Table 1). Significant low levels of two macrophage (MIP-1 α) and monocyte proteins (MCP-1) [15] compared to control group were also observed. MIP levels were 11.4 pg/mL in the active group compared to 26.9 pg/mL in control group ($P < 0.05$); MCP levels was 11.9 pg/mL in the active group compared to 28.7 pg/mL in control group ($P < 0.05$).

All patients successfully completed the clinical follow-up during 12 months with a daily dose of 250 mL of cow's milk.

TABLE 1: Figures of levels of specific IgE against some cow's milk protein fractions in the patient group and control group.

Allergen	Patients group $n = 30$			Control group $n = 30$
	Specific IgE (kU/L)			
	Average	Range	Median	
Whole cow's Milk	189	30–586	146	<0.35
Casein	178	26–544	90	<0.35
α -lactalbumin	21	9–34	21	<0.35
β -lactoglobulin	16	2–38	7	<0.35

A significant decrease in the degree of the sensitization was observed by either *in vivo* (SPT) or *in vitro* (sIgE) tests or both (Table 1). Most of the CMP adverse reactions were recorded during the first 18 weeks of the protocol. Nonscheduled assistance in the ER was needed in only two patients while the rest of the recorded CMP adverse reactions were properly managed and treated by patients, parents, or guardians at home.

Baseline levels (i.e., prior to CMP desensitization) of PDGF in patients were different compared to the nonallergic children (1170 pg/mL and 501 pg/mL, resp.). The basal levels of VEGF were also significantly different in both groups (253 pg/mL and 108 pg/mL). In both cases, the differences were statistically significant with a $P < 0.05$.

Followup of the levels of both PDGF and VEGF factors were determined and were significantly downregulated ($P < 0.05$) 6 and 12 months after fulfilling the CMP desensitization protocol (Figure 1).

There were not any significant differences in the basal levels of some Th₂ cytokines between the active and the control group. IL-4 levels were 22.3 pg/mL in active group and 31.5 pg/mL in control group, IL-5 levels were 12.7 pg/mL in active group versus 15 pg/mL in control group, IL-6 levels were 6.9 pg/mL in active group versus 3.0 pg/mL in control group, IL-8 levels were 21.6 pg/mL in active group versus 21.1 pg/mL in control group, and IL-13 levels were 8.2 pg/mL in active group versus 7.0 pg/mL in control group.

No significant differences were either observed in other cytokines tested in both groups (active and control group at baseline time such as IL-2 (20.0 pg/mL in active group versus 17.5 pg/mL in control group), IL-12p40 (381 pg/mL in active group versus 305.5 pg/mL in control group), IL-12p70 (19.2 pg/mL in active group versus 25.0 pg/mL in control group), IFN- γ (22.3 pg/mL in active group versus 31.5 pg/mL in control group) and TNF- α (17.8 pg/mL in active group versus 14.7 pg/mL in control group), TGF- β (3.9 pg/mL in active group versus 3.5 pg/mL in control group), IL-10 (8.7 pg/mL in active group versus 9.0 pg/mL in control group), and IL17 (12.5 pg/mL in active group versus 13.0 pg/mL in control group).

As shown in Figure 2, no significant differences were found in IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, or IL-13 levels between the basal and 12 months after treatment in the active group. However, differences between basal time and 12 months in active group were near to be significant with $P < 0.1$ with

a trend in the case of IL-5 ($P = 0.06$), IL-6 ($P = 0.09$), and eotaxin ($P = 0.07$) (Figure 2).

Similarly, no significant differences were observed in IL-2, IL-12p40, IL-12p70, IFN- γ and TNF- α , TGF- β , IL-10, and IL17 (Figure 3). However, again a tendency to observe a significant difference was observed in IL-12p40 ($P = 0.08$) and IL-10 levels ($P = 0.09$).

Finally, the basal levels of MCP-1 (11.1 pg/ml) and MIP-1 α (12.1 pg/ml) in children with anaphylaxis were significantly lower than children of the control group (MCP-1 28.4 pg/mL; and MIP-1 α , 29.8 pg/mL). Levels of these downregulated MCP and MIP-1 α did not significantly changed one year after oral immunotherapy as previously observed [15].

Remarkably, in all cases, It must be noted that all assays of each of the cytokines were performed under the same conditions and the same plate at the same time, to avoid differences between assays.

4. Discussion

Anaphylaxis is known as the most severe allergic reaction [3]. Insect sting, drugs, foods, and even mites are able to trigger human anaphylaxis after activating specific receptors on the mast cell surface. IgE- and non-IgE-dependent mechanisms may cause degranulation of mast cells releasing preformed mediators such as histamine, proteoglycans, or serine proteases and also cytokines and *de novo* lipid mediators.

In early 70s a platelet-activating factor was first linked with allergy and IgE response [18]. This factor, so-called PAF, has been recently defined as an important mediator playing a pivotal role that correlates with the severity of anaphylaxis [19, 20]. In fact, the key treatment of anaphylaxis, epinephrine, has also been associated with human smooth muscle cells after stimulation with PAF [21].

In this study, we were looking for different platelet associated factors, such as PDGF since it can not only be synthesized by activated platelets but also be released by activated macrophages [6]. Interestingly, we have found a significant increase of PDGF levels in the CMP anaphylactic children compared to the CMP nonallergic control subjects. Furthermore, those levels of PDGF were later significantly downregulated after the implementation of a specific clinical intervention as a rapid CMP desensitization protocol, while no changes were found within the control children. This group of CMP anaphylactic patients also presents high levels of VEGF, another potent proangiogenic factor that specifically acts on endothelial cells increasing the vascular permeability. In fact, some early findings provided the evidence that human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis [22], the growth of new vessels from preexisting ones, and to some extent VEGF could play an important role in angiogenesis, the subsequent airway remodeling in bronchial asthma [23] and the different phenotypes of asthma [10].

The CMP anaphylactic patients that underwent the two-step CMP rush desensitization had significantly lower levels of PDGF and VEGF-A 6 months after completing the protocol compared to their own baseline determinations. In contrast, the serum levels of the Th₁, Th₂, Th₁₇, and T_{reg} key

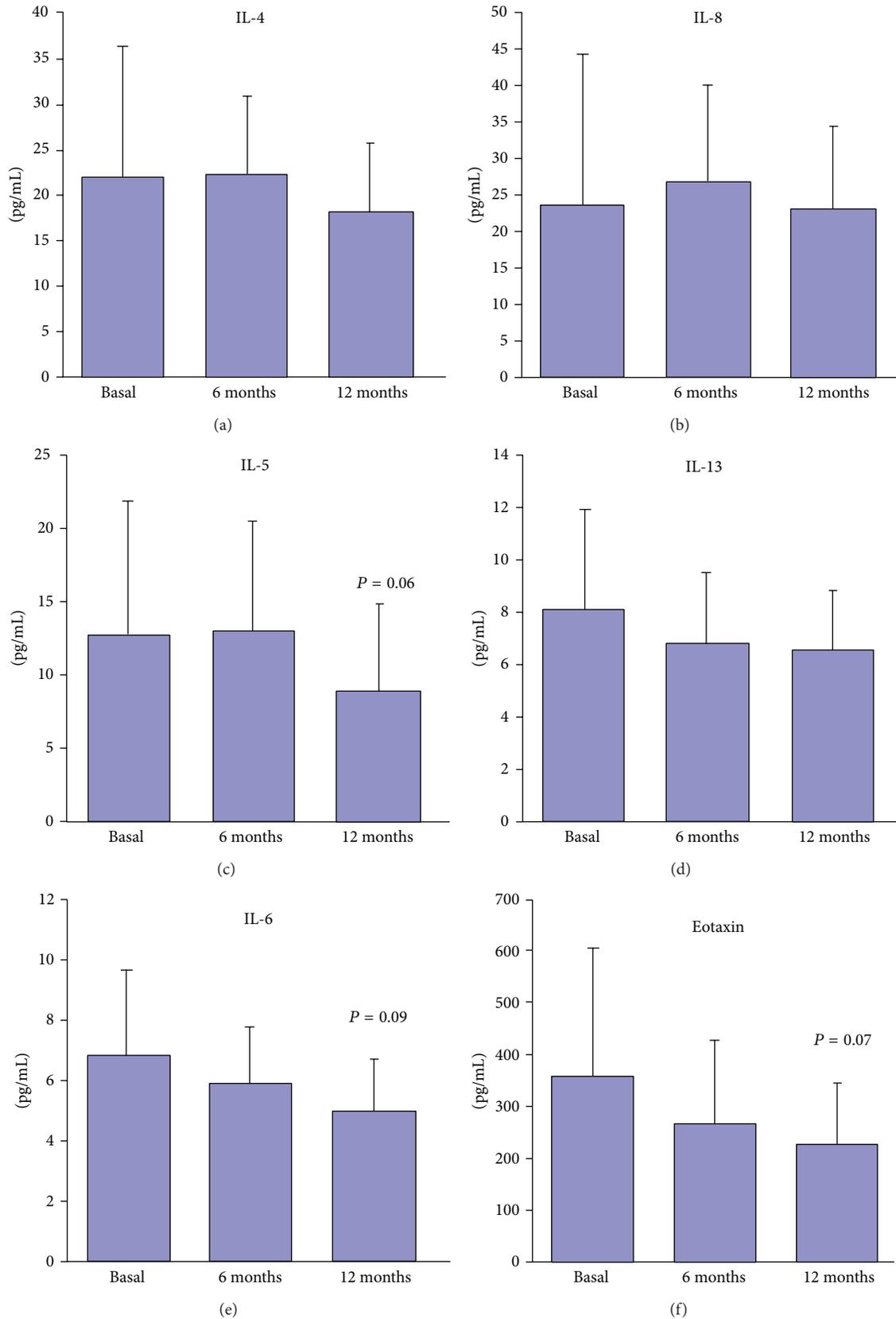


FIGURE 1: Levels of Th₂ cytokines in the active group (mean and standard error of patients—*n* = 30—at basal time and 6 and 12 months). In control group there were no differences at any time.

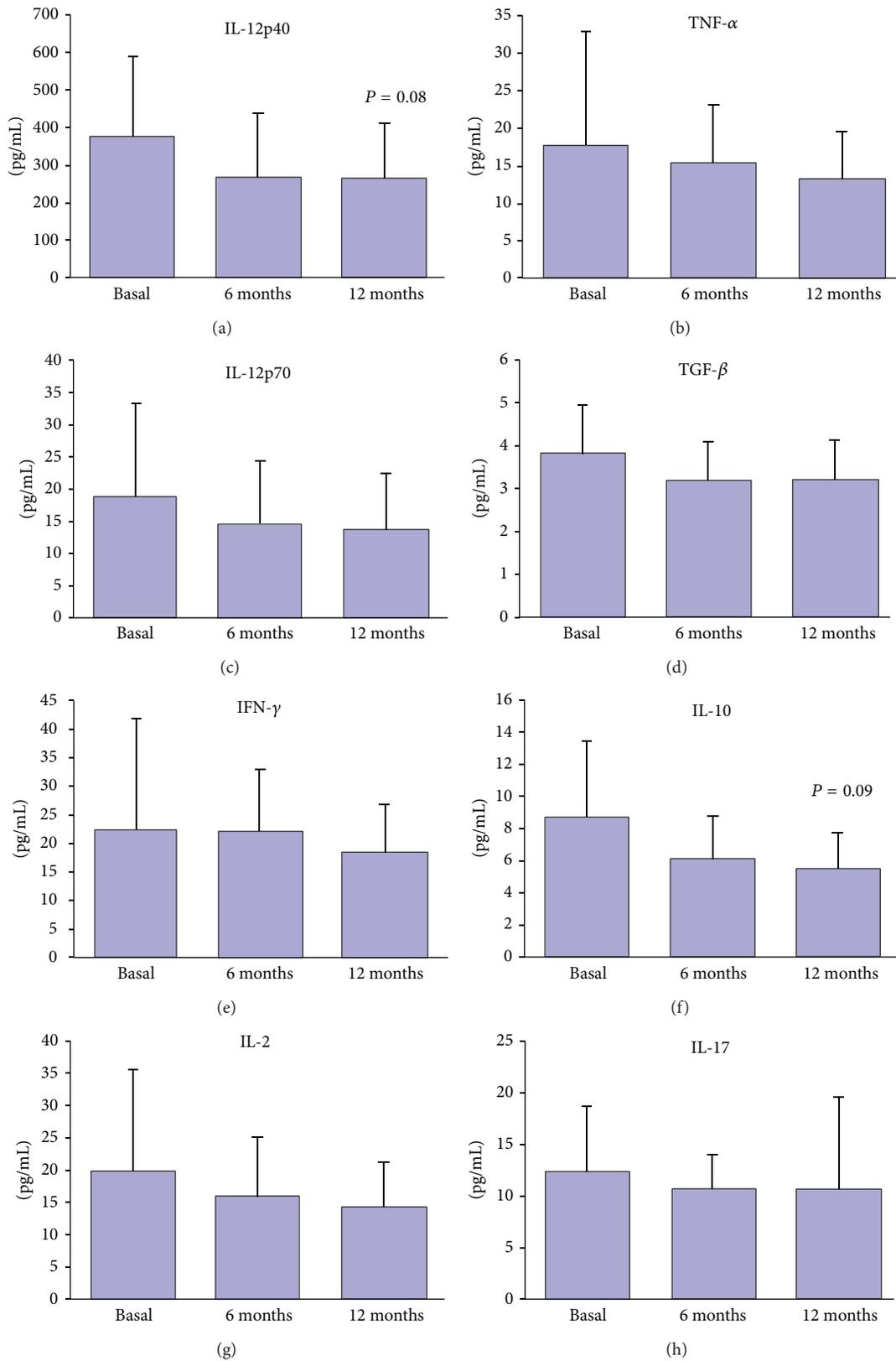


FIGURE 2: Levels of Th₁, some T_{reg} and Th₁₇ cytokines in the active group (mean and standard error of patients— $n = 30$ —at basal time and 6 and 12 months). In control group there were no differences at any time.

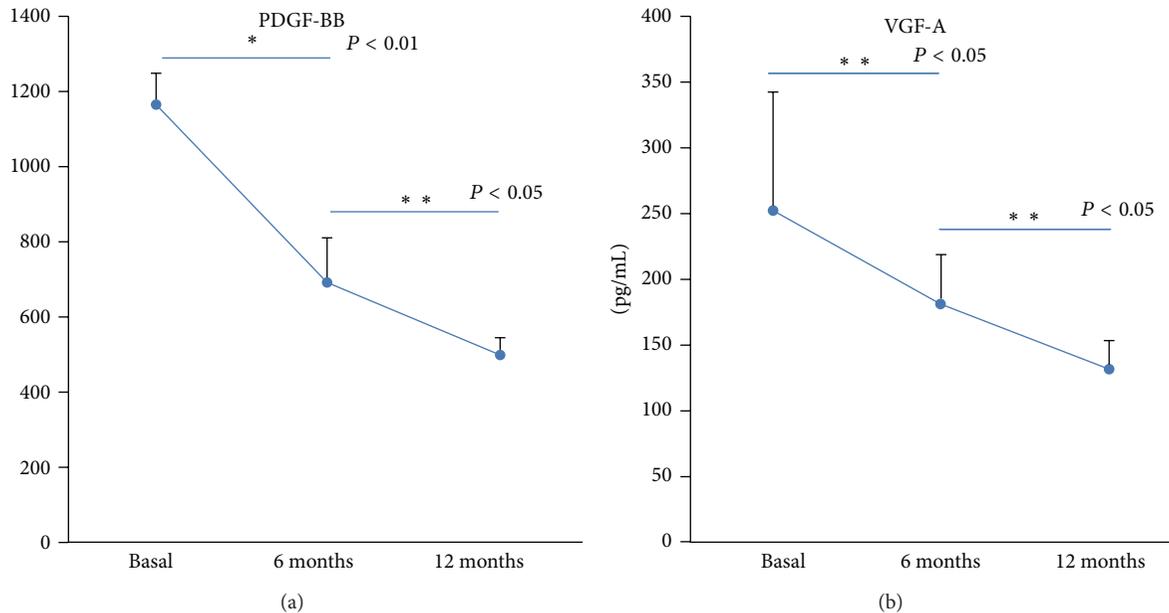


FIGURE 3: Levels of PDGF-bb and VEGF-A in the active group (mean and standard error of patients— $n = 30$ —at basal time and 6 and 12 months). In control group there were no differences at any time.

cytokines did not significantly change throughout the CMP desensitization. However, there are several subtle changes which, although they are not significantly different, have a clear tendency to be. The nonsignificant changes in IL-5 levels were unexpected, although the P value showed a trend ($P = 0.06$). We have highlighted this result as a result that is not statistically significant, but the trend is clear. This result is correlated with the decrease of VEGF and with the decrease of the levels of eotaxin ($P = 0.06$). Similarly, it has been seen with peripheral eosinophils as it has been shown before [24, 25]. However, we did not find any clear tendency in Eosinophilia in our patients. Eosinophilia, which is a marker of allergic processes, especially with respiratory allergy, could increase in cases of occurrence of respiratory sensitization against mites or could decrease in patients with improvement in their atopic dermatitis. All these results would support a cause/effect about the immune-modulatory changes derived from oral immunotherapy. That is why we decided not to include such data in the present paper. All these results would support a cause/effect about the immune-modulatory changes derived from oral immunotherapy.

In case of other important cytokines, we did not see differences. In some cases, such as IFN- γ , we firmly think that the assay is not the optimal procedure to detect subtle changes since the detected levels in our samples were extremely low. This should be better informed to avoid spending time and effort in an assay that is better for other molecules.

Downregulation of both VEGF and PDGF [26] after the rapid IgE desensitization, an antigen-specific method that prevents mast cell degranulation and protects patients from food and drug anaphylaxis, [27] has proved as a valuable method to obtain a temporary immunotolerance. This issue along with the additional oral antigen-specific

immunotherapy may evidence the a possible mobilization of calcium through into voltage-dependent calcium channels in the desensitization of beta-adrenoceptors in the airway smooth muscle as speculated before [28] and this could be linked to the changes in the levels of PGDF [29]. It could also reflect the result of mast cell degranulation and differential inflammatory cell recruitment, in response to the antigen-specific continuous challenge [27].

Desensitization protocols with drugs have been well described but are considered risky procedures [30] although they may become easier to accomplish when the target cells are found in their refractory period [31] as recently revised [32].

After an accurate diagnosis [33, 34], a rush CMP desensitization protocol is an effective therapeutic intervention for patients with persistent CMP allergy to achieve a clinical tolerance, although immunological tolerance is still unclear [15]. As food allergy probably results from a failure of the correct development of ordinary oral tolerance, the oral route in OIT takes advantage of the cells and immune pathways involved in the induction of oral tolerance. The possible mechanisms of oral food desensitization included increased milk-specific IgG4 with decreased levels of specific IgE followed by decreased activation of mast cells and basophils with their related cytokines. The early downregulation either of IgE or mast cell activating factors could address the success of the oral desensitization therapy, even on those patients with basal high levels of CMP sIgE.

At this time it is unclear if a permanent clinical tolerance could be achieved or it is only transient depending on the maintenance of daily dose [2]. Our data proved that CMP desensitization is a complex process with the potential to induce early immunological changes, not only in the humoral

response, that is, sIgE and IgG4, but also in mast cell activity markers, that is, angiogenic factors, that may be of use in the immunological outcome of OIT.

Although this is the first description of the PDGF and VEGF angiogenic factors related to food desensitization in human anaphylaxis, more biological markers are needed to characterize the pathogenesis of this disease.

Ethical Approval

Compilation of data was recorded following European standards of data protection and study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the University Hospital (HUNSC: P.I-35/11).

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contributions

Paloma Poza-Guedes and Yvelise Barrios equally contributed to the paper. P. Poza-Guedes was the main researcher in the fieldwork performing the desensitization in the Paediatric Intensive Care Unit. Y. Barrios was the main researcher in the lab performing all the immunoassays and assessing the results. V. Fuentes, E. Alonso, S. Infante, and L. Zapatero helped in recruiting patients and control group and performing the desensitization in the Allergy Office. I. Sánchez-Machín collaborated in the original idea, helped in recruiting data, performed all the *in vitro study* by immunoassays, and discussed the final version of the paper. A. Franco and R. González collaborated in the original idea, helped in recruiting data, performed all the *in vitro study* by immunoassays, and discussed the final version of the paper. V. Matheu is the principal senior investigator, had the original idea, asked for internal funding, and wrote the final version of the paper. All authors have actively discussed the final version of the paper.

Acknowledgment

The authors declare that the source of funding has been the internal funding of Unidad de Gestión Alergología-Norte, Hospital del Tórax/Ofra.

References

[1] N. J. Avery, R. M. King, S. Knight, and J. O. Hourihane, "Assessment of quality of life in children with peanut allergy," *Pediatric Allergy and Immunology*, vol. 14, no. 5, pp. 378–382, 2003.

[2] J. M. Skripak, E. C. Matsui, K. Mudd, and R. A. Wood, "The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 120, no. 5, pp. 1172–1177, 2007.

[3] F. E. R. Simons, "Anaphylaxis," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 125, no. 2, supplement 2, pp. S161–S181, 2010.

[4] A. M. Branum and S. L. Lukacs, "Food allergy among children in the United States," *Pediatrics*, vol. 124, no. 6, pp. 1549–1555, 2009.

[5] R. V. Hoch and P. Soriano, "Roles of PDGF in animal development," *Development*, vol. 130, no. 20, pp. 4769–4784, 2003.

[6] M. Uutela, M. Wirzenius, K. Paavonen et al., "PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis," *Blood*, vol. 104, no. 10, pp. 3198–3204, 2004.

[7] M. Hoshino, M. Takahashi, and N. Aoike, "Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 107, no. 2, pp. 295–301, 2001.

[8] R. S. Kerbel, "Tumor angiogenesis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 358, no. 19, pp. 2039–2049, 2008.

[9] S. Zraggen, A. M. Ochsenein, and M. Detmar, "An important role of blood and lymphatic vessels in inflammation and allergy," *Journal of Allergy*, vol. 2013, Article ID 672381, 9 pages, 2013.

[10] V. Bhandari, R. Choo-Wing, S. P. Chapoval et al., "Essential role of nitric oxide in VEGF-induced, asthma-like angiogenic, inflammatory, mucus, and physiologic responses in the lung," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 29, pp. 11021–11026, 2006.

[11] D. Ribatti, I. Puxeddu, E. Crivellato, B. Nico, A. Vacca, and F. Levi-Schaffer, "Angiogenesis in asthma," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 39, no. 12, pp. 1815–1821, 2009.

[12] S. S. Kristan, M. M. Malovrh, M. Silar et al., "Airway angiogenesis in patients with rhinitis and controlled asthma," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 39, no. 3, pp. 354–360, 2009.

[13] Y. Zhang, H. Matsuo, and E. Morita, "Increased production of vascular endothelial growth factor in the lesions of atopic dermatitis," *Archives of Dermatological Research*, vol. 297, no. 9, pp. 425–429, 2006.

[14] G. Jimenez-Andrade, A. Ibarra-Sanchez, D. Gonzalez, M. Lamas, and C. Gonzalez-Espinosa, "Innoglobulin E induces VEGF production in mast cells and potentiates their pro-tumorigenic actions through a Fyn kinase-dependent mechanism," *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 6, article 56, 2013.

[15] P. Poza, R. Glez, Y. Barrios, A. Franco, and V. Matheu, "MIP-1alpha, MCP-1, and desensitization in anaphylaxis from cow's milk," *The New England Journal of Medicine*, vol. 367, no. 3, pp. 282–284, 2012.

[16] "Guidance on food allergy in children," *The Lancet*, vol. 377, no. 9767, p. 691, 2011.

[17] F. E. R. Simons and K. J. Simons, "Epinephrine (adrenaline) in anaphylaxis," *Chemical Immunology and Allergy*, vol. 95, pp. 211–222, 2010.

[18] J. Benveniste, P. M. Henson, and C. G. Cochrane, "Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 136, no. 6, pp. 1356–1377, 1972.

[19] P. Vadas, M. Gold, B. Perelman et al., "Platelet-Activating Factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 358, no. 1, pp. 28–35, 2008.

[20] P. Vadas, B. Perelman, and G. Liss, "Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 131, no. 1, pp. 144–149, 2013.

- [21] P. Vadas and B. Perelman, "Effect of epinephrine on platelet-activating factor-stimulated human vascular smooth muscle cells," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 129, no. 5, pp. 1329–1333, 2012.
- [22] I. Puxeddu, A. Alian, A. M. Piliponsky, D. Ribatti, A. Panet, and F. Levi-Schaffer, "Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 37, no. 3, pp. 628–636, 2005.
- [23] M. Hoshino, Y. Nakamura, and Q. A. Hamid, "Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 107, no. 6, pp. 1034–1038, 2001.
- [24] B. Maitre, S. Boussat, D. Jean et al., "Vascular endothelial growth factor synthesis in the acute phase of experimental and clinical lung injury," *European Respiratory Journal*, vol. 18, no. 1, pp. 100–106, 2001.
- [25] Y. Nishigaki, S. Fujiuchi, Y. Yamazaki et al., "Increased vascular endothelial growth factor in acute eosinophilic pneumonia," *European Respiratory Journal*, vol. 21, no. 5, pp. 774–778, 2003.
- [26] P. A. Frischmeyer-Guerrerio, A. L. Guerrerio, K. L. Chichester et al., "Dendritic cell and T cell responses in children with food allergy," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 41, no. 1, pp. 61–71, 2011.
- [27] V. Matias, L. San Feliciano, J. E. Fernandez et al., "Host and environmental factors influencing respiratory secretion of pro-wheezing biomarkers in preterm children," *Pediatric Allergy and Immunology*, vol. 23, no. 5, pp. 441–447, 2012.
- [28] T. Ikenouchi, H. Kume, T. Oguma et al., "Role of Ca^{2+} mobilization in desensitization of β -adrenoceptors by platelet-derived growth factor in airway smooth muscle," *European Journal of Pharmacology*, vol. 591, no. 1–3, pp. 259–265, 2008.
- [29] N. Suganuma, S. Ito, H. Aso et al., "STIM1 regulates platelet-derived growth factor-induced migration and Ca^{2+} influx in human airway smooth muscle cells," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, Article ID e45056, 2012.
- [30] V. Matheu, E. Perez, M. Hernández et al., "Insulin allergy and resistance successfully treated by desensitisation with Aspart insulin," *Clinical and Molecular Allergy*, vol. 3, article 16, 2005.
- [31] A. Prieto-García, D. Zheng, R. Adachi et al., "Mast cell restricted mouse and human tryptase-heparin complexes hinder thrombin-induced coagulation of plasma and the generation of fibrin by proteolytically destroying fibrinogen," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 11, pp. 7834–7844, 2012.
- [32] A. Liu, L. Fanning, H. Chong et al., "Desensitization regimens for drug allergy: state of the art in the 21st century," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 41, no. 12, pp. 1679–1689, 2011.
- [33] M. R. Murali, M. C. Castells, J. Y. Song, D. M. Dudzinski, and R. P. Hasserjian, "Case 9-2011: a 37-year-old man with flushing and hypotension," *The New England Journal of Medicine*, vol. 364, no. 12, pp. 1155–1165, 2011.
- [34] J. J. Ross, A. Saavedra, R. A. Vleugels, A. Liu, and M. C. Castells, "Interactive medical case. A rash hypothesis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 362, no. 24, p. e69, 2010.

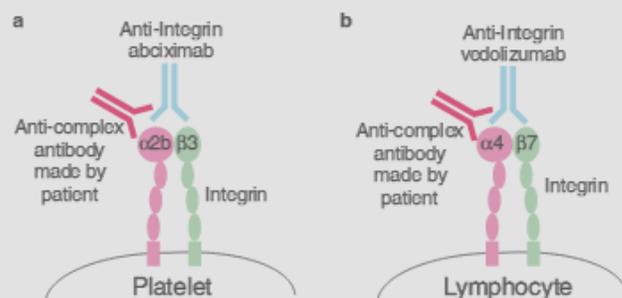


Figure 1. To illustrate the biological plausibility of an unexpected biologic process resulting in reduced specificity of an anti-adhesion therapy, consider the case of abciximab, an anti $\alpha_{2b}\beta_3$ integrin monoclonal. In panel **a**, when patients develop anti-complex antibodies, these stabilize the interaction between the anti-integrin antibody and its target, reducing the specificity of the interaction. Rather than binding only platelets with activated $\alpha_{2b}\beta_3$ integrins, this less-specific binding leads to binding of all platelets and to significant bleeding. Similarly, it is plausible to envision (**b**) that a similar anti-complex antibody could bind both vedolizumab and the α_4 integrin molecule. This would strengthen the binding between vedolizumab and the α_4 integrin, potentially leading to less-specific binding of α_4 integrins (including $\alpha_4\beta_1$ integrins on brain-specific lymphocytes). This unlikely but biologically plausible event could effectively turn vedolizumab into an α_4 -specific antibody (i.e., natalizumab) in these rare patients. This type of rare anti-complex antibody might be more frequent in patients with an autoimmune diathesis.

physicians and pharmaceutical companies that PML could occur.

This brings us to the topic of the biological plausibility of the rare event of PML in association with anti-adhesion therapies. We offer as a cautionary example the unexpected immunologic effect of serum antibodies to Abciximab. This monoclonal antibody therapy was designed to bind to the activated form of platelet glycoprotein IIb/IIIa (aka integrin $\alpha_{2b}\beta_3$), and prevent dotting during endovascular procedures without an excess of clinically important bleeding in most patients. However, some patients developed antibodies against the abciximab/platelet complex, which reduced the specificity of this interaction (3). When one of these rare patients is treated with abciximab, severe thrombocytopenia occurs, and rapid bleeding from all mucosal surfaces ensues. Although it is unlikely that a similar mechanism might reduce the specificity of other anti-integrin monoclonal therapies, it is not impossible.

That this has previously occurred in patients treated with another anti-integrin monoclonal antibody, and that patients with inflammatory bowel disease (IBD) are prone to autoimmune reactions, makes it unlikely but possible that an unforeseen mechanism in rare patients could reduce

the specificity of an anti- $\alpha_4\beta_7$ monoclonal therapy (Figure 1). Sufficient sample size can change a very rare event to a reasonably likely event.

We would like to reiterate that the rule of 3s provides the upper limit of the 95% confidence interval, not the actual estimate of the risk of an event. We agree with the letter writers that PML cases associated with vedolizumab, if they occur at all, will be rare events, and that there are many factors that could affect an estimate of the frequency of rare events, including biological plausibility, latency, and other risk factors.

We are hopeful that anti-adhesion therapies will prove beneficial to millions of patients with IBD worldwide, but we should be prepared for the possibility of rare events, including PML. We hope that if PML does occur in the future in association with the newer anti-adhesion therapies, gastroenterologists, the Food and Drug Administration, and the general public will thoughtfully consider the frequency of rare events and embrace the richness of human diversity. To paraphrase Miranda in Shakespeare's *The Tempest* (V,i), O brave new world, that has such biologic processes in it!

To dismiss the past (abciximab) and deny the possibility of rare risks in the future would make us ill-prepared for an

important potential complication. As vedolizumab leaves the island of clinical trials for the wider world of clinical practice, rare events might occur, but we should not panic or overreact to them. Instead, we should thoughtfully consider the frequency and magnitude of benefits in relation to the frequency and magnitude of rare risks.

CONFLICT OF INTEREST

P.D.R.H. has participated in clinical trials of the anti-adhesion therapies vedolizumab, AMG181, and PF-00547659 as a site investigator.

REFERENCES

1. Feagan BG, Colomel J-F, Hanauer SB *et al*. Comment on 'Anti-adhesion therapies and the rule of 3 for rare events.' *Am J Gastroenterol* 2014;109:1083-4 (this issue).
2. Govani SM, Waljee AK, Higgins PDR. Anti-adhesion therapies and the rule of 3 for rare events. *Am J Gastroenterol* 2013;108:1831-2.
3. Lajus S, Clofent-Sanchez G, Jais C *et al*. Thrombocytopenia after abciximab use results from different mechanisms. *Thromb Haemost* 2010;103:651-61.

¹Division of Gastroenterology, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA. Correspondence: Peter D.R. Higgins, MD, PhD, MSc, Division of Gastroenterology, University of Michigan, SPC 5682, 1150 West Medical Center Drive, Ann Arbor, Michigan 48109, USA. E-mail: phiggins@umich.edu

IP-10 In Pediatric Celiac Disease and Food Allergy

Yvelise Barrios, MD, PhD⁵, Paloma Poza-Guedes, MD²⁵, Inmaculada Sanchez-Machin, MD², Andres Franco, MD¹, Honorio Armas, MD, PhD³, Ruperto Gonzalez, MD, PhD² and Victor Matheu, MD, PhD²⁴

doi:10.1038/ajg.2014.127

To the Editor: We have carefully read the paper recently published in *AJG* (1), in which the authors have described an approach to differentiate the diagnosis of celiac disease (CD) from that of non-celiac patients with

gluten sensitivity. On the other hand, some other authors have recently also shown the utility of detection of interferon- γ (IFN- γ) and IFN- γ -inducible protein-10 (IP-10) by ELISA or IFN- γ ELISpot for the detection of gluten-reactive T cells in HLA-DQ2.5+ associated CD (2). With this in mind, we aimed to study the importance of the detection of IP-10 levels in patients with a debut confirmed diagnosis of CD and to compare these with levels in children affected with food allergies.

Patients with CD had a wide spectrum of gastrointestinal symptoms, isolated or not, including abdominal discomfort, nausea, vomiting, failure to thrive, constipation, or abdominal pain with iron deficiency. All patients of the CD group were positive for anti-transglutaminase antibodies (Tgt Abs), which were detected using anti-IgA fluoroenzymoimmunoanalysis against human and recombinant Tgt (EliA™ Immunocap 250), and for anti-deaminated gliadin antibodies, which were detected using standard ELISA (Quanta Lite™ Gliadin IgA II). The allergy group consisted of subjects with food allergies and hypersensitivity I symptoms as described elsewhere (3). A healthy control group consisted of patients who had assisted in the study of drug allergies and who were negative for either anti-Tgt or anti-Gliadin antibodies. Informed consent from patients and/or controls was obtained. The ethics committee approved the study (PI: 35/11 and PI: 12/14).

IP-10 levels measured using Immunoassay (Procarta, Affymetrix) and read by flow cytometry (Luminex) were higher (statistically significant by the Kruskal-Wallis nonparametric method for three groups) in CD patients ($n=19$; average of 212 pg/ml) compared with control patients ($n=10$; 111 pg/ml). However, levels in CD patients were significantly lower than those in patients with a food allergy ($n=18$; 627 pg/ml). As it has been reported that duodenal biopsies of pediatric CD patients have shown an inflammatory profile consisting of augmented IL8 and IL17 (4,5), we also measured these cytokines. In our sample, IL8 and IL17 were also clearly elevated, thus confirming the possibility of an immunotherapeutic intervention at this point.

It is known that IP-10 is secreted by several cell types such as monocytes, endothelial cells, and fibroblasts in response to IFN- γ . IP-10 has been attributed several roles, such as chemoattraction for monocytes/macrophages. It is possible that the IP-10 levels before intervention are predictive of a favorable response and have a supporting role in differential diagnosis of CD and food hypersensitivity.

CONFLICT OF INTEREST

Guarantor of the article: Victor Matheu, MD, PhD.

Specific author contributions: Yvelise Barrios and Paloma Poza conceived the original idea and were mainly responsible for the work. Inmaculada Sanchez-Machín and Ruperto Gonzalez were responsible for control patients and responsible for the following up of patients with food allergy along with Paloma Poza. Andres Franco was responsible for the *in vitro* assays along with Y. Barrios. Honorio Armas was responsible for following up the patients with celiac disease. Victor Matheu was the senior researcher responsible for the work, had financial support, and wrote the final version of the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Financial support: Supported by self-funding; Unidad de Alergología, Hospital Tórax.

Potential competing interests: Yvelise Barrios, Paloma Poza, Andres Franco, Inmaculada Sanchez-Machín, Ruperto Gonzalez, Honorio Armas, and Victor Matheu declare that they do not have any conflict of interest.

REFERENCES

- Kalbani TA, Vanga RR, Lefler DA *et al*. Celiac disease or non-celiac gluten sensitivity? an approach to clinical differential diagnosis. *Am J Gastroenterol* 2014;109:741-6.
- Ontiveros N, Tye-Din JA, Hardy MY *et al*. *Ex vivo* whole blood secretion of interferon-gamma (IFN-gamma) and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) measured by ELISA are as sensitive as IFN-gamma ELISpot for the detection of gluten-reactive T cells in HLA-DQ2.5+ associated celiac disease. *Clin Exp Immunol* 2014;175:305-15.
- Glez PP, Franco YB, Matheu V. MIP-1alpha, MCP-1, and desensitization in anaphylaxis from cow's milk. *N Eng J Med* 2012;367:282-4.
- Eiro N, González-Reyes S, González L *et al*. Duodenal expression of Toll-like receptors and interleukins are increased in both children and adult celiac patients. *Dig Dis Sci* 2012;57:2278-85.

- Bondar C, Araya RE, Guzman L *et al*. Role of CXCR3/CXCL10 axis in immune cell recruitment into the small intestine in celiac disease. *PLoS One* 2014;9:e89068.

¹Department of Immunology, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain; ²Department of Allergy, Hospital del Tórax, Santa Cruz de Tenerife, Spain; ³Department of Pediatrics, Hospital Universitario de Canarias, San Cristóbal de La Laguna, Spain; ⁴Department of Medical Sciences, Lund University, Lund, Sweden; ⁵The first two authors are considered as shared first authors. Correspondence: Victor Matheu, MD, PhD, Department of Allergy, Hospital del Tórax, Ofra, Santa Cruz de Tenerife 38320, Spain. E-mail: victor.matheu@med.lu.se

A Fatal Case of Diffuse Enteritis After Colectomy for Ulcerative Colitis: A Case Report and Review of the Literature

Joseph D. Feuerstein, MD¹, Sveta Shah, MD¹, Robert Najarian, MD², Deborah Nagle, MD³ and Alan C. Moss, MD¹

doi:10.1038/ajg.2014.118

To the Editor: Colectomy is considered curative in patients with refractory ulcerative colitis (UC). However, case reports exist of patients developing *de novo* jejunitis years after colectomy for UC. We present a case of a fatal severe enteritis that developed immediately following colectomy in a patient with UC, and a review of the literature.

A 56-year-old woman was admitted to our center with hematemesis, high ileostomy output, and lethargy 11 days after a total proctocolectomy for refractory UC. She had a 12-year history of left-sided UC, but relapsed in the last 6 months despite mesalamine. During her preceding admission, enteric infections and cytomegalovirus (CMV) were excluded. She failed to respond to 5 days of IV steroids and salvage therapy with IV cyclosporine. She underwent a proctocolectomy with ileal j-pouch formation, and a diverting loop ileostomy, with a normal-appearing small

Allergy, Asthma & Clinical Immunology

Role of specific IgE to β -lactoglobulin in the gastrointestinal phenotype of cow's milk allergy

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	AACI-D-15-00032
Full Title:	Role of specific IgE to β -lactoglobulin in the gastrointestinal phenotype of cow's milk allergy
Article Type:	Short report
Funding Information:	
Abstract:	<p>Rationale The prevalence of many phenotypes of food allergy is increasing. Specific gastrointestinal (GI) phenotype of food allergy (GI allergy) is also increasing but it is difficult to know the prevalence because of many entities.</p> <p>Methods: A 1 year retrospective study of pediatric patients complaining exclusively gastrointestinal symptoms after cow's milk consumption and at least one positive specific IgE (sIgE) to cow's milk (CM) proteins (CMP) was done (n=39). The most prevalent symptom was abdominal cramps in 35 patients (90%), discomfort or abdominal distention in 30 patients (75%), diarrhea in 10 patients (25%) and constipation in 5 patients (12%).</p> <p>IgA anti-transglutaminase antibodies were absent and lactose intolerance was ruled out in all patients. Average of total IgE on this group was 288 UI/ml. sIgE against β-lactoglobulin was the dominant with an average of 4.14 kU/l. sIgE to casein, which is the dominant protein in systemic anaphylaxis was 1.74 kU/l; sIgE to α-lactoalbumin, the other whey protein, was 0.83 kU/l and sIgE levels to CM were 0.78 kU/l. The quotient sIgE CAS/sIgE BLG in these patients was always lower than 1. Patients experienced an improvement of their symptoms after a cow's milk free diet. An open oral challenge with cow's milk did mimic their initial symptoms in all patients. However, the open oral challenge with dairy products was well tolerated.</p> <p>Conclusions: Patients with a specific phenotype of GI allergy with cow's milk have specific IgE against betalactoglobulin, as a dominant sIgE. These patients could beneficiate of a diet with dairy products.</p>
Corresponding Author:	Victor Matheu Servicio Canario de Salud LA LAGUNA, SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Servicio Canario de Salud
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Paloma Poza-Guedes
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	<p>Paloma Poza-Guedes</p> <p>Yvelise Barrios</p> <p>Ruperto Gonzalez-Perez</p> <p>Inmaculada Sanchez-Machin</p> <p>Andres Franco</p> <p>Victor Matheu</p>
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	<p>Belen de la Hoz</p> <p>Direct competitor in national grants, projects and scholarships</p>

	MD Ibañez Direct competitor in national grants, projects and scholarships
	Montserrat Fernandez-Rivas Direct competitor in national grants, projects and scholarships
	Antonio Martorell Direct competitor in national grants, projects and scholarships

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Brief Report

Role of specific IgE to β -lactoglobulin in the gastrointestinal phenotype of cow's milk allergy

Paloma Poza-Guedes MD, ^a
Yvelise Barrios, MD, PhD ^b
Ruperto González Pérez, MD, PhD ^a
Inmaculada Sánchez-Machín, MD, ^{a, c}
Andres Franco, MD, ^b
Víctor Matheu, MD, PhD ^a,

^a Consulta de Alergia Infantil, Unidad de Alergología-Norte, Hospital del Tórax/Ofra, Spain,

^b Immunology, Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Spain

^c Unidad Alergología-Norte, Hospital Tórax, Complejo Hospital Universitario NS Candelaria, Spain,

Corresponding author

Current address

Victor Matheu, PhD

Victor Matheu, MD, PhD

Consulta de Alergia Infantil, Unidad de Alergología-Norte,
Hospital del Tórax/Ofra, CHUNSC,
Ofra 38320, Spain,

email: Victor.Matheu@gmail.com

1
2
3
4 **Abstract:**
5

6 **Rationale** The prevalence of many phenotypes of food allergy is increasing. Specific
7 gastrointestinal (GI) phenotype of food allergy (GI allergy) is also increasing but it is
8 difficult to know the prevalence because of many entities.
9

10 **Methods:** A 1 year retrospective study of pediatric patients complaining exclusively
11 gastrointestinal symptoms after cow's milk consumption and at least one positive specific
12 IgE (sIgE) to cow's milk (CM) proteins (CMP) was done (n=39). The most prevalent
13 symptom was abdominal cramps in 35 patients (90%), discomfort or abdominal distention
14 in 30 patients (75%), diarrhea in 10 patients (25%) and constipation in 5 patients (12%).
15

16 IgA anti-transglutaminase antibodies were absent and lactose intolerance was
17 ruled out in all patients. Average of total IgE on this group was 288 UI/ml. sIgE against β -
18 lactoglobulin was the dominant with an average of 4.14 kU/l. sIgE to casein, which is the
19 dominant protein in systemic anaphylaxis was 1.74 kU/l; sIgE to α -lactoalbumin, the other
20 whey protein, was 0.83 kU/l and sIgE levels to CM were 0.78 kU/l. The quotient sIgE
21 CAS/sIgE BLG in these patients was always lower than 1. Patients experienced an
22 improvement of their symptoms after a cow's milk free diet. An open oral challenge with
23 cow's milk did mimic their initial symptoms in all patients. However, the open oral
24 challenge with dairy products was well tolerated.
25

26 **Conclusions:** Patients with a specific phenotype of GI allergy with cow's milk have
27 specific IgE against betalactoglobulin, as a dominant sIgE. These patients could beneficiate
28 of a diet with dairy products.
29

30 **Keyword:**
31

32 **cow's milk allergy; food allergy; gastrointestinal allergy; specific IgE,**
33 **betalactoglobulin; casein; anaphylaxis; IgE-mediated allergy.**
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 Food allergy is currently recognized as a rising problem worldwide. Specific
5 gastrointestinal (GI) food allergy (GI allergy) is also increasing ¹ although it is difficult to
6 know the real prevalence because some entities may overlap and many unclear
7 mechanisms are probably involved^{1 2 3}. GI Allergy could be classified into three types
8 according to the implication of immunoglobulin E (IgE) in their pathogenesis, i.e. classical
9 "IgE-mediated entity"; a "combined IgE- and cell-mediated" type and finally,, a "cell-
10 mediated/non-IgE-mediated", consistent with several conditions such as food intolerance
11 or *food protein-induced enterocolitis syndrome*. Interestingly, those patients afflicted with
12 the GI allergy phenotype develop selective gastrointestinal symptoms exclusively *-in*
13 *contrast to systemic anaphylaxis-* hours after the ingestion of offending foods ^{1 4}; they
14 probably belong to the cell-mediated/non-IgE-mediated or combined IgE- and cell-
15 mediated food allergy types which are generally diagnosed on the basis of the clinical
16 manifestations ^{1 4 5}. The final pathogenic mechanisms of GI allergy have not been
17 elucidated yet since the diagnostic approaches are not clear and no consensus has been
18 reached either.

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33 We performed a 1-year observational retrospective study of patients with selective
34 GI symptoms –i.e. *discomfort, abdominal distention, abdominal cramps, flatu-*
35 *lence, nausea, vomiting, constipation or intermittent diarrhea* only over 30 minutes after
36 the intake of a glass of cow's milk. The inclusion criteria also comprise a positive (>0.1
37 kU/l) serum specific IgE (sIgE) to cow's milk proteins (CMP) such as casein (CAS), and the
38 main whey proteins such as α -lactalbumin (ALA) and β -lactoglobulin (BLG). Those
39 patients with confirmed extra-intestinal *-cutaneous, ocular, respiratory and/or*
40 *cardiovascular-* symptoms immediately (less than 30 minutes) occurring after a glass of
41 cow's milk were excluded of the study group. A diagnosis of celiac disease and a diagnosis
42 of lactose intolerance were also considered as exclusion criteria. Two different groups of
43 subjects were used as control groups, both with markedly different clinical features (CM
44 tolerant and CM and anaphylactic) were compared to the study group.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 Skin prick tests (SPT) with commercial extracts of cow's milk proteins (CMP) were
5 performed (IPI; Stallergenes, Spain). Measurement of the total concentration of IgE (tIgE) in
6 each serum was obtained by enzyme-immunoassay (ImmunoCAP, Phadia AB, Uppsala,
7 Sweden). Specific IgE (sIgE) against whole cow's milk (CM), casein (CAS), α -lactoalbumin
8 (ALA) and β -lactoglobulin (BLG) were also measured by the (ImmunoCAP) with a detection
9 limit of 0.1 kIU/L. All patients experienced an open challenge test with cow's milk. Celiac
10 disease and lactose intolerance was ruled out by absence of IgA anti-transglutaminase
11 antibodies ⁶ by enzyme-linked immunoassay (EliA Celikey IgA, Phadia AB, Uppsala,
12 Sweden) and lactose intolerance test, respectively. The protocol was approved by the
13 Regional Ethics Committee. Statistical analysis considered significant differences when $p \leq$
14 0.05 (Mann-Whitney *U* test and Kruskal-Wallis test).
15

16 A total of 336 subjects referring food reactions, out of 1344 pediatric patients were
17 seen in the Outpatient Office during the 12-months study period. Thirty nine subjects
18 (11%) referred gastrointestinal symptoms exclusively *-no other complain at least 30*
19 *minutes after cow's milk consumption-* and showed at least a positive sIgE to CMP. Median
20 of age was 5 y-o and 55% were girls. The most prevalent symptom was abdominal cramps
21 in 35 patients (90%), followed by discomfort or abdominal distention in 30 patients (75%),
22 diarrhea in 10 patients (25%) and constipation in 5 patients (12%).
23

24 SPT with commercial extracts to CMP were positive in only 40% (16 patients). IgA
25 anti-transglutaminase antibodies were absent in all patients ⁶. Average of tIgE on this
26 group was 288 UI/ml (median: 144UI/ml), while sIgE against β -lactoglobulin was dominant
27 among the CMP sIgE profile with an average of 4.14 kU/l (median: 1.67kU/l; range 0,21-
28 33). The other 2 proteins detected were casein, which is the dominant protein in systemic
29 anaphylaxis ⁷ with an average of 1.74 kU/l (median: 0.18kU/l) and another whey protein,
30 α -lactoalbumin, with average of 0.83 kU/l (median: 0.23kU/l). Average of sIgE levels to CM
31 were 0.78 kU/l (median: 0.27kU/l). The quotient sIgE casein/sIgE β -lactoglobulin in this
32 selected population was always lower than 1 (average 0.3).
33

34 All patients experienced a clinical improvement of their symptoms after the
35 implementation of CM free diet. A new open challenge with a glass of CM reproduced the
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 initial symptoms in all patients. A subsequent open oral challenge with dairy products
5 (yogurt) was well tolerated in all patients. Additionally these patients maintained taking
6 dairy products on a daily basis diet (fermented such as yogurt or cheese, and baked such
7 as custard).
8
9

10
11 Bovine β -Lactoglobulin, the major whey protein of cow's milk (~3 g/l), is a small
12 protein, with an 18.4 kDa molecular weight. Unlike the other main whey protein, no clear
13 function has been identified to α -lactalbumin, although a role in the transport of some
14 hydrophobic molecules ⁸ has been suggested. Among bovine whey proteins, BLG is also a
15 known prevalent allergen, as listed in Annex IIIa of Directive 2000/13/EC and
16 demonstrated by both SPT and oral challenges ⁹.
17
18
19
20
21
22

23 The patients with the phenotype of GI allergy have shown low, but positive levels
24 of sIgE against BLG. Patients with this specific phenotype are not susceptible to follow
25 regular CMP desensitization protocols ^{10 7}, which it has been a hot topic in recent years.
26 The current CMP desensitization protocols have been specifically designed for those
27 patients with the classical anaphylaxis phenotype of IgE-mediated reactions ⁷, although no
28 guidelines have been developed to determine whose patients may benefit. Interestingly,
29 the quotient sIgE CAS/sIgE BLG in the patients with the GI allergy phenotype was always
30 lower than 1 (average 0.3) compared to those subjects with anaphylaxis, with a quotient
31 higher than 1 ⁷, given that their dominant allergenic CP is casein.
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 Remarkably 10 patients had levels of sIgE against CM lower than 0.1 kU/l and
42 additionally 12 more subjects showed levels between 0.1 and 0.35 kU/l, which has been
43 the traditional cutoff of many immunoassays of specific IgE. This data is interesting, since
44 many of these patients, with sIgE to CM lower than 0.35 kU/l may be under-diagnosed in
45 the past. The current limit of detection, as low as 0.1 kU/l, for sIgE might help to
46 discriminate among different clinical profiles ¹¹ of allergy. Similarly, ten patients with
47 levels of sIgE against CM lower than 0.1 kU/l, had levels of sIgE to BLG higher than 0.1
48 kU/l. With these findings, we believe that the determination of several proteins including
49 CAS, ALA and BLG, in addition to specific IgE to CM, should be mandatory. The new
50 detection limits of 0.1 kU/l should always be also recommended. It was only noticed that
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 in these subjects with this phenotype of patients, the sensitivity of sIgE quite higher than
5 the SPT with commercial CM extracts, detecting only 40% of patients with a positive SPT.
6
7

8 A diet including dairy products but free of cow's milk has been useful with strong
9 positive consequences in their nutrition. Just as it has been shown that heat diminishes
10 the reactivity of milk^{12,13} or egg¹⁴, fermentation some dairy may help to decrease some
11 proteins. In the yogurts it has been shown BLG detection greatly diminished compared to
12 fresh milk ¹⁵ . Even many yogurts have shown an absence of BLG; while other proteins
13 such as CAS and ALA remain present in these yogurts. It is not known the cause why this
14 happens. This could be argued because processing of dairy products could stimulate
15 polymerization of BLG, which is the major whey protein of cow's milk, in tetramers that
16 probably changes spatial distribution of allergen epitopes ¹² and decreasing allergenicity in
17 children and adults with an IgE-mediated cow's milk allergy ¹⁶. Since there are differences
18 between different products ¹², it would also be necessary that manufacturers prove the
19 presence or absence of BLG in natural form to unsure their labeling convinces the
20 requirements to identify BLG in food products. Further studies should be performed to
21 delineate this GI allergy phenotype and if it is suitable to maintain dairy products in these
22 patients. More studies are necessary in defining all possible different phenotypes.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **List of Abbreviations**

39 Immunoglobulin E (IgE)
40 Gastrointestinal food allergy (GI allergy)
41 Specific IgE (sIgE)
42 Total IgE (tIgE)
43 Whole cow's milk (CM)
44 Cow's milk proteins (CMP)
45 Casein (CAS),
46 α -lactoalbumin (ALA)
47 β -lactoglobulin (BLG)
48 Skin prick tests (SPT)
49
50
51
52
53
54
55
56

57 **Conflict of interest statements**

58 All authors declare they currently do not have any conflict of interest
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Role of funding source

Authors declare that the source of funding has been the internal Funding of *Unidad de Gestión Alergología-Norte, Hospital del Tórax/Ofra*.

Authors' contributions

P. Poza-Guedes was the main researcher in the fieldwork performing the desensitization in the Paediatric Intensive Care Unit.

Y. Barrios was the main researcher in the lab performing all the immunoassays and assessing the results.

I. Sanchez-Machín & R. González collaborated in the original idea, helped in recruiting data, performed all the *in vitro study* by immunassays and discussed the final version of the manuscript.

A. Franco assisted in the lab performing immunoassays and assessing the results.

V. Matheu is the principal senior investigator, had the original idea, asked for internal funding and wrote the final version of the manuscript.

All authors have actively discussed and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

We would like to thank to all registered nurse and lab technician involved in this study.

Ethics committee approval

Compilation of data was recorded following European standards of data protection and study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Region (HUNSC: P.I-35/11 & 24/14).

Table 1: Figures of levels of specific IgE against some cow's milk protein fractions in the G-I group and Anaphylaxis group.

	GI allergy n=39			Anaphylaxis n=20			Significance p
	Average	Range	Median	Average	Range	Median	
total IgE (IU/ml)	288	16-2360	144	457	295-2500	360	<0.01
Allergen specific IgE (kU/l)							
Whole Cow's Milk	0.74	0 - 2.48	0.26	189	30- 586	146	<0.01
Casein	1.74	0 - 4.8	0.18	178	26- 544	90	<0.01
α- lactoalbumin	0.83	0 – 3.7	0.23	21	9 – 34	21	<0.01
B- lactoglobulin	4.14	0.10 - 33.4	1.67	16.2	2.1 -38	7.25	<0.01
RATIO Casein/ B- lactoglobulin	0.30	0.08 - 0.99	0.22	20	2.1 -99	9.5	<0.01

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **References**
5
6
7

- 8 1. Morita H, Nomura I, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K. Gastrointestinal food
9 allergy in infants. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of*
10 *Allergology* 2013;62:297-307.
11
12 2. Iacono G, Cavataio F, Montalto G, Soresi M, Notarbartolo A, Carroccio A. Persistent
13 cow's milk protein intolerance in infants: the changing faces of the same disease. *Clinical*
14 *and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical*
15 *Immunology* 1998;28:817-23.
16
17 3. Wang J, Lin J, Bardina L, et al. Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of
18 milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy. *The Journal*
19 *of allergy and clinical immunology* 2010;125:695-702, e1- e6.
20
21 4. Iacono G, Cavataio F, Montalto G, et al. Intolerance of cow's milk and chronic
22 constipation in children. *The New England journal of medicine* 1998;339:1100-4.
23
24 5. Crowley ET, Williams LT, Roberts TK, Dunstan RH, Jones PD. Does milk cause
25 constipation? A crossover dietary trial. *Nutrients* 2013;5:253-66.
26
27 6. Barrios Y, Poza-Guedes P, Sanchez-Machin I, et al. IP-10 in pediatric celiac disease
28 and food allergy. *The American journal of gastroenterology* 2014;109:1085-6.
29
30 7. Poza P, Glez R, Barrios Y, Franco A, Matheu V. MIP-1alpha, MCP-1, and
31 desensitization in anaphylaxis from cow's milk. *The New England journal of medicine*
32 2012;367:282-4.
33
34 8. Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. Invited review: beta-lactoglobulin: binding
35 properties, structure, and function. *Journal of dairy science* 2004;87:785-96.
36
37 9. Costa AJ, Sarinho ES, Motta ME, Gomes PN, de Oliveira de Melo SM, da Silva GA.
38 Allergy to cow's milk proteins: what contribution does hypersensitivity in skin tests have
39 to this diagnosis? *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European*
40 *Society of Pediatric Allergy and Immunology* 2011;22:e133-8.
41
42 10. Poza-Guedes P, Barrios Y, Fuentes V, et al. Downregulation of angiogenesis factors,
43 VEGF and PDGF, after rapid IgE desensitization and oral immunotherapy in children with
44 food allergy. *BioMed research international* 2014;2014:372567.
45
46 11. Caubet JC, Ford LS, Sickles L, et al. Clinical features and resolution of food protein-
47 induced enterocolitis syndrome: 10-year experience. *The Journal of allergy and clinical*
48 *immunology* 2014;134:382-9.
49
50 12. Ehn BM, Ekstrand B, Bengtsson U, Ahlstedt S. Modification of IgE binding during
51 heat processing of the cow's milk allergen beta-lactoglobulin. *Journal of agricultural and*
52 *food chemistry* 2004;52:1398-403.
53
54 13. Nowak-Wegrzyn A, Bloom KA, Sicherer SH, et al. Tolerance to extensively heated
55 milk in children with cow's milk allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*
56 2008;122:342-7, 7 e1-2.
57
58 14. Lemon-Mule H, Sampson HA, Sicherer SH, Shreffler WG, Noone S, Nowak-Wegrzyn
59 A. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. *The*
60 *Journal of allergy and clinical immunology* 2008;122:977-83 e1.
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

15. Ruprichová L, Dracková M, Borkovcová I, Vorlová L. Determination of proteins in yoghurt. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2012;1:644-50.

16. Olivier CE, Lima RP, Pinto DG, et al. In search of a tolerance-induction strategy for cow's milk allergies: significant reduction of beta-lactoglobulin allergenicity via transglutaminase/cysteine polymerization. *Clinics (Sao Paulo)* 2012;67:1171-9.

980

Factors involved in the efficacy of the oral induction of tolerance in patients with cow's milk allergy

Reche, M¹; Valbuena, T¹; Fiandor, A²; Padial, M¹; Martín-Esteban, M²; Pascual, C¹

¹Allergy, Hospital Infanta Sofía, Madrid, Spain; ²Allergy, Hospital La Paz, Madrid, Spain

Background: The aim of this study was to evaluate predictors factors in the efficacy of an induction oral tolerance (OTI) protocol in children with severe cow's milk allergy (CMA).

Method: A group of patients with diagnosis of CMA, were selected for a double-blind, placebo-controlled food challenge. Oral desensitization was performed with increasing doses starting with 0.01 mg of cow's milk (CM) proteins until 200 ml of CM daily. The initial duration of OTI was performed in 4 months. Several variables were measured to predict the efficacy of his protocol of OTI.

Result: Forty-two children older than 3 years, (mean 3.5 years), 19 females, 23 males, and a diagnosis of CMA were included. All the challenges performed were positive; 17 patients developed anaphylaxis. In 18 patients, OTI were done without adverse side effects and completed the protocol in the time programmed. In 21 patients OTI were complicated because adverse side effects moderate, and/or children need more time to complete the protocol. In two patients OTI protocol was failed because severe and repeated side-effects. Specific IgE to casein ($P < 0.001$), positive family history of atopy ($P < 0.002$) and persistent atopic dermatitis ($P < 0.001$) are associated with more adverse side reactions and less possibility of success of this OTI protocol.

Conclusion: Several factors could predict a better clinical response to a OTI protocol in patients with milk allergy.

981

Milk oral immunotherapy in school-aged children with immunoglobulin E-mediated cow's milk allergy

Paasilta, M¹; Salmivesi, S¹; Korppi, M¹; Mäkelä, M²
¹Pediatric Research Center, University of Tampere and Tampere University Hospital, Pediatric Department, Tampere, Finland; ²Helsinki University Hospital, Skin and Allergy Hospital, Helsinki, Finland

Background: Cow's milk (CM) allergy (CMA) is common in young children. Though spontaneous recovery often takes place before school age, especially in the case of delayed reactions, IgE-mediated CMA may continue until adolescence and even until adulthood. Currently, the standard care of food allergy is strict allergen

avoidance, restricting the every-day life of allergic persons. OIT (Oral immunotherapy) seems to be a promising treatment in children with severe and persistent food allergy.

Methods: We enrolled 28 children 6–14 years of age, with CMA (cow's milk allergy) diagnosed by an oral challenge test, into a randomized, double-blind, placebo-controlled OIT study. Patients were randomized by using a 2 : 1 ratio into active or placebo treatment arms. In the treatment group, the amount of milk protein increased daily, being doubled every week, from 0.06 to 6400 mg. The first dose (0.06 mg) and eight later doses were given in the outpatient clinic. All other dose increases were done at home. In the active treatment, the amount of CM protein was increased during 23 weeks from 0.06 mg to a maximum of 6400 mg (200 ml of milk).

Results: Twenty-four (86%) patients completed the protocol: 16/18 children in the active treatment group and 8/10 in the placebo group. In the active group, two children dropped out because of abdominal complaints. In the placebo group, one child discontinued the study due to motivation problems and one due to an accidental CM anaphylaxis. The children were contacted by phone 12 months after the last visit, and 13 (81%) used daily CM or milk products corresponding 6400 mg of milk protein. After double-blind OIT, all 10 children in the placebo group attended and completed successfully an open-label OIT by an identical protocol. Six months later, all of them used daily milk at least 200 ml.

Conclusion: The desensitization succeeded in 89% of the patients. Thus, OIT is efficacious in desensitizing children with CMA, and the achieved desensitization continues at least 12 months after OIT. When data of the two groups were combined, 92% of all children tolerated daily milk or milk products. Thus, the placebo-controlled, double-blind study confirmed that OIT is effective in desensitizing children with CMA, and the 12-month open-label milk consumption evidenced that an achieved desensitization continues when milk or milk products are in daily use.

982

Oral immunotherapy for cow's milk allergy with a weekly up dosing regimen: a randomised double blind controlled study

Pajno, G¹; Caminiti, L¹; Ruggeri, P²; de Luca, R³; Vita, D⁴; La Rosa, M⁵; Passalacqua, G⁵

¹Department of Pediatric, Allergy Unit, Messina University, Messina, Italy; ²Department of Resp. Diseases, Messina University, Messina, Italy; ³Department of Emergency Medicine, Messina University, Messina, Italy; ⁴Department of Pediatrics, Messina University, Messina, Italy; ⁵Department of Pediatrics, Catania Uni-

versity, Catania, Italy; ⁶Department of Internal Medicine, Genoa University, Genoa, Italy

Background: Cow milk allergy in children is a relevant problem in medical practice. Oral desensitisation was proposed as a suitable therapeutic approach, but current protocols are time-consuming and impractical.

Objective: We established a patient-friendly desensitisation, with a weekly-up dosing regimen, and evaluated it in a randomised controlled trial.

Methods: Thirty children with IgE-mediated cow milk allergy, confirmed by double-blind placebo-controlled food challenge, were equally randomised to desensitisation with cow milk or soy milk as control. The desensitisation with weekly up-dosing lasted 18 weeks. The occurrence and severity of reactions after each dose was evaluated and the desensitisation was stopped if severe reactions occurred. Specific IgE and IgG4 to cow milk were measured at baseline, after 8 weeks and at the end. The double blind food challenge was repeated once the desensitisation was completed or after premature discontinuation.

Results: Two and one patients from the active and control group, respectively, dropped out. Full tolerance to cow milk (200 ml) was achieved in 10 active patients, and partial tolerance in one. Two active patients discontinued the desensitisation for severe reactions, whereas no reaction occurred in controls, who maintained unchanged their sensitivity to milk. A significant increase of specific IgG4 was found only in the active group.

Conclusion: The weekly-up dosing desensitisation protocol for cow milk allergy performed under medical supervision is effective and reasonably safe and induces consistent immunological changes.

983

Rush desensitisation in children with milk induced anaphylaxis

Poza-Guedes, P; González-Pérez, R; Iglesias-Souto, J; Matheu-Delgado, V; Pérez-Rodríguez, E; Sánchez-Machín, I
 Allergy Department, HUNS La Candelaria, Santa Cruz, Tenerife, Spain

Background: Cow's milk proteins allergy has a self-resolution outcome of 60–70% by 3 year-old children. The most frequent clinical intervention is complete avoidance of such proteins. The aim of the present work is to induce clinical tolerance in children with severe and persistent milk allergy.

Methods: We selected patients older than 2 years old with persistent milk protein allergy and severe recurrent clinical reac-

tions by accidental ingestion despite correct restrictive diet. We performed a 2-day desensitization procedure in the pediatric critical care unit of our hospital. Starting from 1/100 milk dilution the patients were exposed to increasing doses up to 4 ml of undiluted milk. The second phase of the present study was scheduled in the outpatient clinic to reach in a 6-week period a final cumulative dose of 250 ml of undiluted milk (i.e. a glass of milk).

Results: Ten children (Range: 2–15 y.o.; median 6 y.o.) with milk-induced anaphylactic reactions were selected. Persistent rhinitis and/or asthma was identified as a common comorbidity condition to all patients. Only one patient did not reach the 4 ml dose during the initial rush protocol phase although all children were able to tolerate 250 ml of undiluted milk in less than 10 weeks.

Conclusion: A newly developed rush desensitization protocol for children with persistent cow's milk allergy may be an effective therapeutic intervention to achieve an unrestricted diet.

984

Specific oral tolerance induction (SOTI) as an useful treatment to cow milk proteins (CMPs) allergy

Martorell, A¹; de la Hoz, B²; Ibañez, M³; Bone, J⁴; Michavila, A⁵; Plaza, A⁶; Alonso, E⁷; Garde, J⁸; Nevot, S⁹; Echevarria, L¹⁰; Santana, C¹¹; Cerdá, J¹²; Escudero, C¹³; Guallar, I¹⁴; Piquer, M¹⁵; Zapatero, L¹⁶; Ferré, L¹⁷; Felix, R¹⁸; Terrados, S¹⁹; Bracamonte, T²⁰; Muriel, A²¹; Martínez, T²²

¹Hospital General Universitario., Allergy Unit, Valencia, Spain; ²Hospital Ramón y Cajal, Allergy, Madrid, Spain; ³Hospital Universitario Niño Jesús., Allergy, Madrid, Spain; ⁴Hospital Miguel Servet, Allergy, Zaragoza, Spain; ⁵Hospital General, Allergy, Castellón, Spain; ⁶Hospital San Joan de Déu., Allergy Department, Barcelona, Spain; ⁷Hospital Gregorio Marañón, Allergy Department, Madrid, Spain; ⁸Hospital General Universitario., Allergy Unit, Elche, Spain; ⁹Hospital Sant Joan de Deu., Allergy Department, Manresa, Spain; ¹⁰Hospital Severo Ochoa, Allergy, Leganés, Spain; ¹¹Hospital General, Allergy Department, Segovia, Spain; ¹²Hospital General, Allergy Department, Valencia, Spain; ¹³Hospital Niño Jesús, Madrid, Spain; ¹⁴Hospital Miguel Servet, Zaragoza, Spain; ¹⁵Hospital San Joan de Déu, Barcelona, Spain; ¹⁶Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ¹⁷Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain; ¹⁸Hospital General, Valencia, Spain; ¹⁹Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; ²⁰Hospital Severo Ochoa, Madrid, Spain; ²¹Hospital Ramón y Cajal, Biostatistical Unit, Madrid, Spain; ²²Fundación Hospital General, Valencia, Spain

Background: The current options for the management of food allergy are based on strict antigen avoidance, and waiting for the development of tolerance. Limited published evidence shows specific oral tolerance induction (SOTI) to be a potential intervention option. Our hypothesis is that SOTI should be started early in order to improve its efficacy and to prevent CMPs persistent allergy. The aim of this study was to evaluate the safety and efficacy of

SOTI in 2-year-old children with CMP allergy, as an alternative treatment to elimination diet.

Methods: We carried out a multicentre study. Children diagnosed with IgE-mediated allergy to CMPs, with clinical manifestations of immediate hypersensitivity reaction to cow's milk and a double-blind placebo-controlled challenge (DBPCFC) to cow's milk were included and randomly assigned into two different groups SOTI or control group.

Results: A total of 60 children aged two years (range 24–36 months) were recruited, 30 children (group A: treatment group) began SOTI immediately, whereas the remaining 30 (group B: control group) were kept on a milk-free diet and followed-up on for 1 year. After this 1-year period, 90% of the children in group A had become completely tolerant *versus* 10% of the children in group B, desensitization protocol achieved efficacy with a relative risk (RR) of 3.86. In group A, following variables decreased significantly from the initial to the last assessment timepoint: cow's milk cutaneous threshold concentration (median 3 µg/ml to 3 mg/ml, $P < 0.0001$) serum specific IgE to milk (mean $27.45 \pm SD 28.49$ kU/l to mean $11.54 \pm SD 13.84$ kU/l, $P < 0.0001$) and casein (mean $22.58 \pm SD 26.62$ kU/l to $7.89 \pm SD 12.21$, $P < 0.0001$). Group B showed no significant change in same variables after 1 year of follow-up. Twenty-four patients (80%) developed some reaction during the treatment period: 14 children developed mild reactions (48%) and 10 moderate reactions (35%). The most common manifestations were rash, followed by digestive symptoms and cough.

Conclusion: In this study, SOTI was found to be effective in a significant percentage of 2-year-old children with cow's milk allergy.

985

Shrimps' food allergy improves in the course of sublingual immunotherapy for mites in an allergic patient. Case report

Cortellini, G¹; Santucci, A¹; Spadolini, I²; Corvetta, A¹; Passalacqua, G³

¹Internal Medicine, Rimini Hospital, Rimini, Italy; ²Allergo spa Immunotherapy Research, Florence, Italy; ³Allergy and Respiratory Disease, Genoa Hospital, Genoa, Italy

Many studies demonstrate that immunotherapy for respiratory allergy for birch pollen can improve food allergy for apple by means of common allergen bet v1, similar to Mal D1. Curiously we find opposite symptoms in patients with respiratory allergy for house dust mites associated to food allergy for shrimps, through the common allergen tropomyosin. In effect it's

described the incidence of anaphylactic reactions to shrimps in the course of mites immunotherapy. An hypothetical explanation is that the dosage of tropomyosin in mites immunotherapy is too low for desensitization, but enough to sensitize. It's possible to find an optimal dosage of tropomyosin in mites ITS to treat shrimps food allergy?

Clinical case: A 15 years old mites allergic male, with mild persistent asthma and rhinitis and associated food allergy for shrimps and seafood with anaphylactic symptoms: urticaria, glottis angioedema, asthma and enteritidis. Three years ago in November after the informed consent of parents the patient started the Sublingual immunotherapy (SLIT) for house dust mites. Immunoblotting confirmed the presence of IgE for tropomyosin in the patient's serum as to as in the SLIT extract for mites. Biological data before SLIT. Skin prick test average diameter: in dermatophagoides pteronyssinus 12 mm, in dermatophagoides farinae 13 mm, in schrimp 9 mm. Specific IgE to Tropomyosin :52 Ku; specific IgE to schrimp 63 Ku. The patient took mites standardized SLIT without adverse events; the maintenance's dose was of five drops a day (double of recommended dosage, to achieve enough cumulative dosage of tropomyosin), for 12 months. Symptoms were controlled at the end of the study, after 12 months. The score of symptom/drug for asthma and rhinitis were significantly decreased; drugs intake decreased of 40%. After 12 months oral challenge with shrimps caused in the patient an oral allergic syndrome without systemic symptoms. Prick test average diameter: in shrimps 5 mm; in dermatophagoides pteronyssinus 10 mm; in dermatophagoides farinae 6 mm. IgE for tropomyosin were 45. Finally the improvement of clinical and biological data for this patient suggests the hypothesis that side effects in the course of mites immunotherapy in patients with food allergy for shrimps depend by a low dosage of tropomyosin in these extracts. On the other hand high tropomyosin dosage can promote food desensitization.

986

Oral desensitisation in children with immunoglobulin E-mediated cow's milk proteins allergy

Cardenas Contreras, R¹; Alonso-Llamazares, A¹; Beitia Mazuecos, J¹; Vega Castro, A¹; Moreno, A²; Benito Jimenez, J³

¹H.U.Guadalajara, Allergy, Guadalajara, Spain; ²H. Virgen de la Luz, Allergy, Cuenca, Spain; ³H.U.Guadalajara, O.R.L, Guadalajara, Spain

368 Rate Of Anaphylaxis Caused By Oral Immunotherapy In Children With Cow's Milk Allergy

Prof. Giovanni B. Pajno, MD, FAAAAI¹, Dr. Giuseppe Crisafulli^{1,2}, Dr. Giuseppina Salzano^{1,2}, Dr. Roberta Vadalà^{1,2}, Dr. Stefania Arasi^{1,2}, Dr. Salvatore Barberi³, Dr. Lucia Caminiti^{1,2}; ¹University of Messina, Messina, Italy, ²Dept of Pediatrics, Allergy Unit, University of Messina, ³Pediatric Clinic, San Paolo Hospital, University of Milan, Milan, Italy.

RATIONALE: The safety represents the major concern for the treatment of IgE mediated food allergy with oral immunotherapy (OIT). The aim of the survey was the detection of the rate of Anaphylaxis during immunotherapy with cow's milk (CM – OIT).

METHODS: Since 2006 we have treated 48 patients with CM – OIT. Children of both sexes aged 4 to 14 years (median 9 yrs) with demonstrated IgE mediated cow's milk allergy (CMA) underwent OIT with a weekly up-dosing protocol. Reactions severity, during up dosing regimen(s) was assessed through the 'Grading of Food Induced Anaphylaxis according to Severity of Clinical Symptoms' which could be summarized from grade 1 to 5. Grade 3 to 5 were considered as severe or life threatening events.

RESULTS: One patient had symptoms of grade 3 and two patients had symptoms of grade 4, none had symptoms of grade 5. Therefore, among children who underwent OIT a rate of 6% of severe or life-threatening side effects was detected. These children had been successfully treated with i.m. Adrenaline, plus other rescue medications, and desensitization was stopped. Of note, the appearance of mild to moderate adverse effects was quite frequent in the remaining children.

CONCLUSIONS: Among 48 children treated with CM-OIT, 3 (6%) had anaphylactic reactions which were well controlled with i.m. Adrenaline. Therefore, CM –OIT could be considered rather safe in the majority of patients. However, in our opinion, immunotherapy with cow's milk or other foods could be performed only in selected medical centers and under strict medical supervision.

369 Long-Term Follow Up In Cow's Milk Anaphylaxis After Successful Rush Oral Immunotherapy

Mrs. Paloma Poza-Guedes, Dr. Ruperto González-Pérez, Dr. Inmaculada Sánchez-Machín, MD, Dr. Victor Matheu, MD; Hospital del Tórax-Ofra, Sta Cruz de Tenerife, Spain.

RATIONALE: Oral food desensitization is a promising therapeutic approach in patients with persistent cow's milk allergy (CMA). Although it seems that these protocols show a better outcome in those afflicted with "milder" symptoms (i.e. non anaphylactic reactions) there are controversial results in highly sensitised subjects.

METHODS: Patients with persistent CMA and severe uncontrolled anaphylactic symptoms despite a correct restrictive diet. We performed a two-day desensitization procedure at the Pediatric Critical Care Unit in our Institution. Starting from a 1/100 milk dilution, the patients were progressively exposed to increasing doses up to 4 ml of undiluted milk. The second phase of the current study was weekly scheduled in the Outpatient clinic to reach a final cumulative dose of 250 ml of undiluted milk. Clinical and serological data were collected every six months for a five-year period.

RESULTS: Ten children (2-15 y.o.) were included. All children reached the final dose of 250 ml of undiluted milk in less than ten weeks. Significant clinical and serological changes were obtained not only in the first six months but during the subsequent five years.

CONCLUSIONS: Highly sensitised CMA patients may benefit from rush oral Cow's Milk immunotherapy. Clinical and serological changes have been found both at early and long-term stages of the follow-up.

370 Milk Oral Immunotherapy. Standard Versus Personalized Protocols: Efficiency and Safety

Alberto Alvarez-Perea, MD, Dr. Elena Alonso-Lebrero, PhD, Fernanda Freire, MD, Dr. Sonsoles Infante, MD, Victoria Fuentes-Aparicio, MD, Lydia Zapatero, MD; Hospital Materno Infantil Gregorio Marañón, Pediatric Allergy Department, Madrid, Spain.

RATIONALE: To determine the security, efficacy and efficiency of personalized oral immunotherapy (OIT) protocols based on the results of the challenge test in children with cow's milk allergy.

METHODS: A retrospective, observational study was led in our pediatric allergy unit. Patients with persistent milk allergy that had undergone OIT treatment were included. Anaphylactic patients were excluded. Patients were divided into groups, depending on the OIT protocol. Group 1: personalized protocol based on the tolerance threshold demonstrated in challenge test. Group 2 (control): selected patients that had undergone conventional 14 weeks protocol, starting at 0.1 ml. Data stored and analyzed with SPSS 20. Quantitative variables were expressed as median and range, qualitative variables were expressed as frequencies. Associations were determined through Mann-Whitney test and Fisher's exact test.

RESULTS: Group 1: 42 patients (26 boys, 16 girls), age 5 years (1-7), starting dose 15 ml (5-100). Group 2: 58 patients (38 boys, 20 girls), age 4 years (1-10). No significant differences were found for sex, age, athma, AD, other food allergy, sIgE to milk, casein, beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and severity of symptoms. Duration of treatment was shorter in group 1 (11, 4-35 weeks) than group 2 (14, 6-56 weeks) (p=0,009), number of adverse episodes was smaller in group 1 (1, 0-7) than group 2 (3, 1-15) (p<0,0001). There were no differences for success rate (group 1: 100%; group 2: 94,8%).

CONCLUSIONS: The determination of tolerance threshold has proven useful to design personalized OIT protocols. Custom milk OIT allowed an increase in efficiency and security, while maintaining efficacy.



POSTER PRESENTATION

Open Access

Oral cow's milk immunotherapy: clinical and serological data in long-term follow up

Paloma Poza Guedes*, Ruperto González Pérez, Inmaculada Sánchez Machín, Victor Matheu Delgado

From Food Allergy and Anaphylaxis Meeting 2014
Dublin, Ireland. 9-11 October 2014

Rationale

Oral food immunotherapy is a promising therapeutic approach in patients with persistent cow's milk allergy (CMA). Although it seems that these protocols show a better outcome in patients with "milder" symptoms (i.e. non anaphylactic reactions) there are controversial results in highly sensitized subjects.

Methods

We select patients with persistent CMA and severe uncontrolled anaphylactic symptoms despite a correct restrictive diet. We performed a two-day desensitization procedure at the Pediatric Critical Care Unit in our Institution. The second phase was weekly scheduled in the Outpatient clinic to reach a final cumulative dose of 250 ml of undiluted milk. Clinical and serological data were collected every six months for a five-year period.

Results

Fifteen children (2-16 y.o.) were included. All children reached the final dose of 250 ml of undiluted milk in less than ten weeks. Clinical follow-up every 6 months remained during 5 years to register all adverse reactions and possible factors involved. Serological changes were obtained every six months during the subsequent five years, including specific IgE and IgG4.

Conclusion

Anaphylactic CMA patients may benefit from rush oral Cow's Milk immunotherapy. Clinical and serological changes have been found both at early and long-term follow-up. Several factors were involved in reactions for temporary loss of tolerance.

Published: 30 March 2015

Santa Cruz de Tenerife, Canary Islands, Spain

doi:10.1186/2045-7022-5-S3-P158

Cite this article as: Poza Guedes *et al.*: Oral cow's milk immunotherapy: clinical and serological data in long-term follow up. *Clinical and Translational Allergy* 2015 **5**(Suppl 3):P158.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



820 Clinical Characteristics of Peanut Allergic Patients in a Midwest, Suburban-Based, Private Allergy Practice

John A. Eckman, MD, FAAAAI¹, Tiffany Forde², Lawrence J. Newman, MD, FAAAAI¹, Steven A. Sutton, MD, FAAAAI¹; ¹Allergy and Asthma Associates, Inc., Cincinnati, OH, ²TriHealth Hatton Research Institute.

RATIONALE: Clinical characteristics of peanut allergic patients may vary based on the population studied; they are understudied in private, community-based practices.

METHODS: Records of possible peanut allergic patients (clear reaction history or sensitization without a reaction history) undergoing challenges were reviewed.

RESULTS: Of 39 patients (27 male; median age 79 months) undergoing a peanut open oral challenge (pOC), 14 had a prior clinical reaction (11 skin, 2 GI, 1 skin and lower respiratory) while 25 were avoiding peanut based on sensitization alone. The mean peanut skin prick test wheal (pSPT) was 7 mm; the mean peanut IgE (pIgE) was 7.05 kU/L. Eight patients failed the pOC; 4 with a previous clinical history. Median pSPT/pIgE in those patients who passed were 5 mm / 0.72 kU/L versus those who failed 10/1.6. pSPT > 9 mm was more likely to occur in patients who failed (n=4) versus passed (n=3) pOC (p=0.0099) Logistic regression revealed increasing wheal size was a predictor of oral peanut challenge outcome (p=0.024). Five patients who passed the pOC had pIgE >5 kU/L but no previous reaction history. Correlation between pSPT and pIgE was 0.087 (p=0.597).

CONCLUSIONS: The predictive values of pSPT and pIgE for clinical peanut allergy in a community based practice likely differ from those published by academic medical centers. pSPT > 9 mm is associated with a failed challenge.

821 Peanut Allergy: An Epidemiologic Analysis of a Large Database

Frederick E. Leickly, MD, MPH, FAAAAI^{1,2}, Girish V. Vitalpur, MD, FAAAAI², Kirsten Kloepper, MD MS³; ¹Riley Hospital for Children at Indiana University Health North, Carmel, IN, ²Riley Hospital for Children at Indiana University Health, Indianapolis, IN, ³Indiana University, Indianapolis, IN.

RATIONALE: With the focus of peanut allergy leaning towards therapy, we started a patient database to prospectively follow children with peanut allergy (PA) or peanut sensitization (PS) in order to better characterize our population.

METHODS: Children seen in our clinic with newly diagnosed or established PA/PS were enrolled in our IRB approved database.

RESULTS: Over 3 years (2011-2014), 700 PA/PS children were registered. 64% were male, 80% were white and 10% were African-American. 17% had public insurance. Concomitant diagnoses included: 61% had atopic dermatitis, 45% had asthma. 14% had a sibling with PA/PS. 71.4% had a second food sensitivity/allergy: 20% milk, 43% egg and 39% tree nuts. 463 (66%) had a history of reacting to peanut, 34% avoided peanut due to a positive test without reaction history. The average age at exposure in those with PA was 2 years. Reactions included anaphylaxis (37%), contact urticaria (28%), and diffuse urticaria (18.1%). Peanut specific-IgE (ImmunoCap) was similar between those with no history of reacting (15 kU/L) and both those with diffuse urticaria (17 kU/L) and contact urticaria (13 kU/L). Anaphylaxis was associated with a higher value of 25 kU/L. 11 children reported a history of multiple reactions to peanut, with 6 reactions being more severe, anaphylaxis. Peanut challenges were successful in 41/62. Component testing was performed in 42.

CONCLUSIONS: Our large population of PA/PS children have undergone an extensive evaluation and continue to be followed in our clinic. As we begin analyzing the data we hope to see associations between reaction history, lab values and tolerance/desensitization.

822 Gastrointestinal Phenotype of Cow's Milk Food Allergy: Prevalence

Victor Matheu, MD, PhD¹, Paloma Poza-Guedes, MD², Ruperto Gonzalez, MD, PhD², Inmaculada Sánchez-Machín, MD³; ¹Hospital Quiron Tenerife, Santa Cruz de Tenerife, Spain, ²Alegocan, Santa Cruz de Tenerife, Spain, ³Clinica Tecnosana Tenerife, El Rosario, Spain.

RATIONALE: The phenotypes of IgE-mediated food allergy are heterogeneous. Patients with a phenotype exclusively gastrointestinal (g-i) are increasing but the prevalence is still unknown.

METHODS: We designed a multicenter 1-y retrospective study of pediatric patients with a diagnosis of food reaction to cow's milk (CM) and g-i symptoms (COLIVAC study) such as discomfort, abdominal cramps, constipation or intermittent diarrhea more than 1 h after intake of a CM glass. A non-matched group with anaphylactic symptoms (<1 h after intake) was taken as control. Skin prick test (SPT) with commercial extracts of CM proteins (CMP) (Stallergenes, France) and in vitro IgE (limit detection of 0.1 kU/L, Phadia, Termofisher, IL) were determined. Protocol was approved by Regional Ethics Committee (CHUNSC:24/14).

RESULTS: From 1344 pediatric patients seen in 1-y, 306 were seen because of food reactions. Thirty nine out of 306 (12.75%) were complaining exclusively g-i symptoms. Median age was 5 y-o (n=39; range 2-10 y-o) compared to anaphylaxis group (3 y-o; n=30). SPT were positive in only 20 patients (at least one positive CMP \geq 3mm). Median of total IgE was 146 UI/ml compared to 595 UI/ml in anaphylaxis group. Median of specific IgE against whole CM was 0.43 kU/L compared to 38 kU/L in anaphylaxis group.

CONCLUSIONS: Gastrointestinal phenotype of food allergy with cow's milk has prevalence 12.7% in our region. This specific phenotype has a different profile with less total IgE, less specific IgE to CM and lower SPT diameter compared to anaphylaxis phenotype. Another biomarker would be necessary.

823 A Novel Description of Polyarthralgia with Alpha-Gal Allergy

Aaron K. Pinion, DO¹, Selina A. Gierer, DO²; ¹University of Kansas Medical Center, ²University of Kansas, Kansas City, KS.

RATIONALE: Southern tick-associated rash illness (STARI) is a disease characterized by erythema migrans and flu-like symptoms that is temporally associated with a bite from *Amblyomma americanum* (Lone Star tick). Preliminary polymerase chain reaction studies have suggested that STARI is caused by *Borrelia lonestari*, a spirochete closely related to *Borrelia burgdorferi*. Delayed anaphylaxis to red meat with an elevated serum IgE to galactose-alpha-1,3-galactose occurring with STARI has not been reported.

METHODS: IgE to Galactose-Alpha-1,3-Galactose was performed at ViraCor-IBT Laboratories Incorporated.

RESULTS: Patient is a 38 year old male with recurrent episodes of anaphylaxis manifested by urticaria, angioedema, shortness of breath, wheezing, diarrhea and hypotension. Episodes occurred 6-8 hours after ingesting red meat. IgE to alpha-gal was elevated at 12.10kU/L. He complained of a rash, polyarthralgia, and fatigue with a recent tick bite. Given his clinical presentation, the fact that Lyme Disease is uncommon in this area, and his elevated IgE to alpha-gal, the patient was suspected of having STARI caused by a bite from the Lone Star tick. He was empirically treated with doxycycline 100mg by mouth twice daily for 10 days and had complete resolution of polyarthralgia and fatigue. He avoided red meat and had no further episodes of anaphylaxis.

CONCLUSIONS: We believe this is the first reported case of STARI in a patient with delayed anaphylaxis to red meat as a result of a Lone Star tick bite. Clinicians should be aware of STARI as a potential diagnosis in patients with alpha-gal allergy who have concurrent flu-like symptoms, polyarthralgia, and a characteristic rash.

835 Assessing the Risk Reduction Achieved By Lowering the Regulatory Threshold for Sulfite Labeling in Foods to Asthmatics

Ernest K. Kwegir-Afful, PhD, Lauren Brookmire, MS, Romina Shah, PhD, Stefano Luccioli, MD; Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, College Park, MD.

RATIONALE: There is need to understand if reducing the regulatory limit of 10 ppm for declaring sulfites in food products benefits sulfite-sensitive asthmatics.

METHODS: We evaluated the risk to sulfite-sensitive asthmatics presented by 12 foods/drinks suspected to contain sulfites at concentrations below 10 ppm. The risk to this group was assessed because they are more likely to suffer an allergic-type reaction to sulfiting agents. Sulfite concentrations in foods were obtained from data generated by FDA field laboratories using the Optimized Monier-Williams method. Exposure to sulfites from consuming each of these foods was estimated using consumption data extracted from the 2007-2010 NHANES database. Data from published oral sulfite challenge studies in asthmatics were fit to a Weibull distribution ($\kappa=0.95$; $\lambda=38.71$) to generate a dose-response model, and quantitative risk assessment methods were used to assess comparative risk reduction if the sulfite threshold for labeling exemption was reduced to 5 ppm.

RESULTS: At the current threshold (10 ppm), we found, with 88% and 75% confidence respectively, that estimated reaction rates to fruit juices and cola drinks, would be 1 in 10,000 exposures or less. This confidence increased for fruit juice and cola drinks (93% and 82% respectively) if the threshold were reduced to 5ppm. Ten other foods did not show increases in confidence indicating no benefit in decreasing the threshold for these foods.

CONCLUSIONS: The current risk assessment suggests that reducing the threshold limits for sulfites to 5 ppm will result in minimal reductions in reaction risk to sulfite-sensitive asthmatics for a few select foods.

836 (1) Childhood Food Allergy and the Hygiene Hypothesis

Ashley Dyer, MPH^{1,2}, Ruchi Gupta, MD, MPH³, Anne Marie Singh, MD⁴, Bridget Smith, PhD⁵, Xiaobin Wang, MD, MPH, ScD⁶, Jacqueline A. Pongracic, MD, FAAP⁷; ¹Ann and Robert H. Lurie Children's Hospital, Chicago, ²Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago, IL, ³Northwestern Feinberg School of Medicine, Chicago, IL, ⁴Division of Allergy-Immunology, Department of Pediatrics, Ann & Robert H. Lurie Children's Hospital of Chicago, Chicago, IL, ⁵Ann, Chicago, IL, ⁶Johns Hopkins University School of Public Health, Baltimore, MD, ⁷Ann & Robert H. Lurie Children's Hospital of Chicago, Chicago, IL.

RATIONALE: Childhood food allergy and related atopic diseases are increasing. Although the exact mechanism of this increase is not known, it has been hypothesized that changes in overall hygiene and infection risk play an important role. The hygiene hypothesis suggests that early exposure to infections decreases the risk for atopic disease by altering Th-2 immune response to a more balanced response.

METHODS: 1,359 children from families with at least one food-allergic child, aged 0-21, were included from a family-based cohort. Parents were asked questions about various measures of microbial exposure. Multiple logistic regression models were constructed to identify characteristics significantly associated with the development of food allergy or asthma.

RESULTS: No significant associations were identified between food allergy status and hygiene exposures including: c-section birth, early infections, antibiotic use, pet ownership, childcare, and breastfeeding for children with food allergy. Children had higher odds of developing asthma if they had a cold (OR 1.38; 1.86 – 3.85) or RSV (OR 2.68; 1.86 – 3.85) during their first year; or if they spent time in a childcare center (OR 1.23; 0.90 – 1.68). Children with cats had lower odds of developing asthma than children without cats (OR 0.53; 0.36-0.79).

CONCLUSIONS: There are differential associations between early microbial exposures and food allergy versus asthma. For food allergy, no hygiene measures were significant. Further research is needed to better

understand the common versus specific mechanism underlying the development of food allergy and asthma.

837 The Effect of Pediatric Food Allergy on Caregiver Quality of Life: A Study in Asian Population

Pantipa Chatchatee, MD, Thipaporn Furangseroj, MD, Narissara Suratannon, MD, Jarungchit Ngamphaiboon, MD; Division of Allergy and Immunology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

RATIONALE: Food allergy is associated with decreased caregiver quality of life (QoL). While incidence of food allergy has been increasing worldwide, studies of caregiver QoL are limited in Asian population. We aimed to evaluate the effect of pediatric food allergy on caregiver QoL in a population treated in a tertiary care center in Thailand.

METHODS: Fifty caregivers of children with food allergy were enrolled. The Food Allergy Quality of Life –Parental Burden (FAQL-PB) form was used to measure the effect of pediatric food allergy on caregiver QoL. Generalized linear model was used to identify the factors associated with QoL.

RESULTS: Over all mean QoL score in the population was 3.56. The mean question score for families whose children had 3 or more food allergies compared with those with 2 or fewer was 4.18 vs 3.21; $P < 0.05$. The factors which were significantly associated with the QoL were parental highest education level ($p < 0.01$), allergic to more than 3 foods ($p < 0.05$), and soy allergy ($p < 0.05$).

CONCLUSIONS: Caregivers of food-allergic children had significantly impaired QoL. Type of food allergens, having multiple food allergies and level of parental education can significantly affect caregiver QoL. In our population, soy allergy was associated with worse caregiver QoL. Type of food allergens that affect QoL may vary among populations with different dietary tradition.

838 Oral Cow's Milk Immunotherapy: Relevant Cofactors during Long-Term Follow-up

Paloma Poza-Guedes¹, Ruperto González, MD, PhD², Inmaculada Sanchez-Machín, MD³, Victor Matheu, MD, PhD¹; ¹Hospital del Tórax-Ofra, Sta Cruz de Tenerife, Spain, ²Hospital Ofra-Tórax, S/C de Tenerife, Spain, ³Hospital del Tórax-Ofra, SC Tenerife, Spain.

RATIONALE: Oral food immunotherapy is a novel therapeutic approach in patients with persistent cow's milk allergy (CMA). Several clinical and individual factors have been considered critical to achieve a successful and long-lasting CMA desensitization.

METHODS: We select patients with persistent CMA and severe uncontrolled anaphylactic symptoms under food immunotherapy for at least two years. Desensitization procedure was performed in the Pediatric Critical Care Unit in the initial phase. The second phase was weekly scheduled in the Outpatient clinic to reach a final cumulative dose of 250 ml of undiluted milk. Clinical and serological data were collected every six month in long-term follow-up.

RESULTS: Twenty-seven children (2-17 y.o.) were included. All children reached the final dose of 250 ml of undiluted milk in less than ten weeks. Clinical follow-up every 6 months remained during 3-5 years to register all adverse reactions and possible factors involved. Serological changes were obtained every six months during the subsequent five years. Clinical, physical and psychological factors were recorded.

CONCLUSIONS: Anaphylactic CMA patients may benefit from rush oral Cow's Milk immunotherapy. Clinical and serological changes have been found both at early and long-term follow-up. We record several factors involved in reactions that induce temporary loss of tolerance.

