

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Papel de las células T reguladoras en la alergia a proteínas de
leche de vaca no mediada por IGE en la infancia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Jimena Pérez Moreno

Directores

César Sánchez Sánchez
Rafael Correa Rocha

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA



TESIS DOCTORAL

**“PAPEL DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS
EN LA ALERGIA A PROTEINAS DE LECHE DE
VACA NO MEDIADA POR IGE EN LA INFANCIA”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

JIMENA PÉREZ MORENO

DIRECTORES DEL ESTUDIO:

DR. CÉSAR SÁNCHEZ SÁNCHEZ

DR. RAFAEL CORREA-ROCHA

MADRID, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA



TESIS DOCTORAL

**“PAPEL DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS
EN LA ALERGIA A PROTEINAS DE LECHE DE
VACA NO MEDIADA POR IGE EN LA INFANCIA”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

JIMENA PÉREZ MORENO

DIRECTORES DEL ESTUDIO:

DR. CÉSAR SÁNCHEZ SÁNCHEZ

DR. RAFAEL CORREA-ROCHA

MADRID, 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. JIMENA PÉREZ MORENO,
estudiante en el Programa de Doctorado CIENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS,
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

PAPEL DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS EN LA ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA NO MEDIADA POR IGE EN LA INFANCIA

y dirigida por: DR. CÉSAR SÁNCHEZ SÁNCHEZ Y DR. RAFAEL CORREA-ROCHA

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 23 de mayo de 2019

Fdo.: Jimena Pérez Moreno

Firmado digitalmente por
Jimena Pérez Moreno
Nombre de reconocimiento
(DN): cn=Jimena Pérez Moreno,
o, ou, email=jimenper@ucm.es,
c=ES
Fecha: 2019.05.23 12:31:02
+02'00'

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Dr. César Sánchez Sánchez, adjunto de la Sección de Digestivo Infantil del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y Profesor Asociado de Pediatría de la Universidad Complutense de Madrid

Dr. Rafa Correa-Rocha, adjunto de la Sección de Inmunorregulación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón

CERTIFICAN:

Que **Doña Jimena Pérez Moreno** ha realizado bajo nuestra dirección y supervisión el proyecto de investigación titulado:
PAPEL DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS EN LA ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA NO MEDIADA POR IGE EN LA INFANCIA.

Esta tesis doctoral aborda desde un punto de vista clínico e inmunológico un tema de relevancia clínica en el campo de la Gastroenterología Pediátrica y la Alergia Infantil. El estudio realizado implica la profundización sobre la fisiopatología de la alergia a proteínas leche de vaca con especiales implicaciones clínicas. Con el desarrollo de estudios como el presentado en esta tesis doctoral, se pueden conseguir marcadores específicos, inicialmente para las formas clínicas más severa de este tipo de alergia, proctocolitis y enterocolitis, permitiendo un diagnóstico más específico con un tratamiento dietético adecuado, y por otro lado extrapolar sus aplicaciones a otras formas leves de la misma. Por último, destacar que el diseño del estudio empleado en esta tesis nos permite profundizar en la evolución del sistema inmunitario y la respuesta alérgica tras la supresión de la proteína exógena y conocer su recuperación posterior. La calidad del análisis de datos realizado, así como la discusión, comparando sus resultados con los escasos estudios previos, otorgan una alta calidad científica al proyecto de esta tesis.

El presente trabajo reúne a nuestro juicio, las condiciones de originalidad y rigor metodológico para ser leído y defendido públicamente ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, se firma el presente certificado en Madrid a 6 de marzo de 2019.

Fdo. Dr. César Sánchez Sánchez

Dr. Rafa Correa-Rocha



*La medicina es una ciencia de la incertidumbre y un arte de la
probabilidad.*

(William Osler)

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directores de Tesis:

Dr. César Sánchez Sánchez por su paciencia, cariño y apoyo. Por sus ánimos para continuar y confiar en el trabajo bien hecho. Por su tiempo y dedicación como tutor de residente, tutor de tesis y profesor. Por formarme en la gastroenterología pediátrica y en la investigación científica.

Dr. Rafael Correa-Rocha por su dedicación e interés en el campo de la alergia infantil. Por compartir sus conocimientos y ayudarnos a aplicarlos a la práctica clínica.

También me gustaría agradecer al resto del equipo de Digestivo infantil, en especial al Dr. Guillermo Álvarez Calatayud por ofrecerme la hipótesis del presente estudio, por su cariño y confianza en mí desde siempre. Gracias a Mar Tolín por colaborar en el estudio y por estar siempre ahí como buena amiga en lo bueno y en lo malo.

A Esther Bernaldo de Quirós, por su dedicación y apoyo en la interpretación de resultados inmunológicos. Por su disponibilidad y colaboración en el reclutamiento de pacientes.

A la Dra. Rosa Rodríguez, por guiarme en el campo de la Investigación Científica. Por contagiarme de su esfuerzo y trabajo continuo para alcanzar cualquier meta y superar las contrariedades.

A Alejandro Chico por animarme a terminar la tesis y ayudarme en el soporte tecnológico. Por transmitirme coraje e ilusión en mis objetivos y darme apoyo y cariño para llevarlos a cabo.

A mi familia por enseñarme la importancia del esfuerzo y la responsabilidad. A mi madre por ser un símbolo de lucha continua y a mi hermano por su cariño y ayuda en la maquetación del trabajo.

A Blanca Toledo por su apoyo y su amistad. Por estar a mi lado en los momentos malos y transmitirme esperanza e ilusión. Al resto de compañeros de Pediatría Hospitalaria, por ayudarme en la recogida de controles sanos.

Al equipo de Alergia infantil, en especial la Dra. Fuentes-Aparicio y la Dra. Elena Alonso por contagiarme de su interés en el campo de la alergia infantil desde el primer año de residencia.

A la Facultad de Medicina, por las sesiones de preparación de tesis y la documentación del campus virtual.

Al personal del Laboratorio de Inmuno-regulación por su colaboración en el estudio. Al laboratorio de Hormonas del Hospital Gregorio Marañón por su profesionalidad.

A José Manuel Bellón por su ayuda con el análisis estadístico.

A la enfermería del Hospital infantil Gregorio Marañón por la recogida de muestras biológicas.

A los niños incluidos en el estudio y sus familiares, por su generosidad altruista al colaborar en el estudio.

ÍNDICE

INDICE

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

RESUMEN Y ABSTRACT	0
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS.....	5
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	9
1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA	11
1.1. <i>ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA.....</i>	<i>11</i>
1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	11
1.1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES ALÉRGICAS	12
1.1.3. ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA NO MEDIADAS POR IgE.....	12
1.1.3.1. SÍNTOMAS MENORES DE ALERGIA o FORMAS ATÍPICAS....	15
1.2. <i>PROCTOCOLITIS ALÉRGICA</i>	<i>17</i>
1.2.1. DEFINICIÓN Y CUADRO CLÍNICO	17
1.2.2. DIAGNÓSTICO DE PROCTOCOLITIS ALÉRGICA.	19
1.2.2.1. GUÍAS DE PRÁCTICA CLÍNICA	19
1.2.2.2. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN PROCTOCOLITIS ALÉRGICA	23
1.2.3. TRATAMIENTO E HISTORIA NATURAL DE LA PROCTOCOLITIS ALÉRGICA.....	24
1.3. <i>RESPUESTA INMUNOLÓGICA Y ALERGIA ALIMENTARIA</i>	<i>27</i>
1.3.1. CONCEPTOS BÁSICOS DE INMUNOLOGÍA: INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA.	27
1.3.2. COMPONENTES CELULARES Y MOLECULARES DEL SISTEMA INMUNITARIO	30
1.3.2.1. COMPONENTES DE LA INMUNIDAD INNATA.....	30
1.3.2.2. COMPONENTES DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA.....	33
1.3.3. INFLUENCIA DE LA EDAD EN EL SISTEMA INMUNOLÓGICO... 38	
1.3.4. LA VITAMINA D Y EL SISTEMA INMUNE	38
1.4. <i>RESPUESTAS INMUNES IMPLICADAS EN LA ALERGIA ALIMENTARIA Y TOLERANCIA INMUNOLÓGICA</i>	<i>39</i>
1.4.1. ALERGIA ALIMENTARIA IgE-MEDIADA	40
1.4.2. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA.....	41
1.4.3. REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE	42
1.4.3.1. CÉLULAS T-REG EN PREMATUROS	43

1.4.3.2. ESTUDIOS PREVIOS CON CÉLULAS T-REGULADORAS (T-reg) EN ALERGIA.	43
1.4.3.3. LAS CÉLULAS T-REG EN LA ALERGIA INFANTIL.....	44
1.4.3.4. LAS CÉLULAS T-REG EN LA INDUCCIÓN A LA TOLERANCIA ORAL	44
1.4.4. FISIOPATOLOGÍA DE LAS ALERGIAS NO-IgE MEDIADAS (PROCTOCOLITIS ALÉRGICA)	45
1.4.4.1. CÉLULAS T-REGULADORAS EN PROCTOCOLITIS ALÉRGICA	46
CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN	49
CAPÍTULO 3: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
3.1. HIPÓTESIS-PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	53
3.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	55
3.2.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	55
3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
3.2.3. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	55
CAPÍTULO 4: POBLACIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	61
4.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
4.3. SUJETOS DE ESTUDIO.....	68
4.3.1. CASOS.....	68
4.3.2. CONTROLES SANOS:.....	69
4.4. VARIABLES DEL ESTUDIO.....	69
4.4.1. VARIABLES CLÍNICAS.	69
4.4.2. VARIABLES INMUNOLÓGICAS.....	72
4.5. CRONOGRAMA	75
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	76
4.7. ASPECTOS ÉTICOS Y PROTECCIÓN DE LOS SUJETOS PARTICIPANTES.....	77
CAPÍTULO 5: RESULTADOS	81
5.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA	83
5.1.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DEL GRUPO CONTROL	83
5.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON PROCTOCOLITIS.....	84
5.1.3. TRATAMIENTO DE LA PROCTOCOLITIS	86
5.1.4. EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES	87

5.1.5. COMPARACIÓN DE CASOS DE PROCTOCOLITIS RECOGIDOS EN T0 CON LOS RECOGIDOS EN FASE RESOLUCIÓN.....	89
5.1.6. COMPARACIÓN DE CASOS-CONTROLES EN CUANTO A CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASALES.....	91
5.2. ESTUDIO INMUNOLÓGICO DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO.....	92
5.2.1. POBLACIONES LINFOCITARIAS.....	92
5.2.2. ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS T-CD4.....	97
5.2.3. ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS B.....	99
5.2.4. ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS.....	101
5.2.5. ANÁLISIS DE POBLACIONES MIELOIDES.....	103
5.2.5.1. Análisis de la población de basófilos.....	107
5.2.5.2. Análisis de las células dendríticas.....	108
5.2.5.3. Análisis de monocitos.....	109
5.2.5.4. Análisis de las células NK (%).....	110
5.2.6. ANÁLISIS DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE CITOQUINAS.....	111
5.3. ESTUDIO DE CORRELACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS.....	112
5.4. CURVAS ROC DE LOS MARCADORES INMUNOLÓGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE PROCTOCOLITIS.....	114
5.5. CORRELACIÓN CLÍNICO-INMUNOLÓGICA.....	118
5.3.1. CORRELACIÓN CON EL SCORE CLÍNICO.....	118
5.3.2. EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES SEGÚN EL TRATAMIENTO RECIBIDO PARA LA PROCTOCOLITIS ALÉRGICA.....	119
5.6. ANÁLISIS DE VALORES DE VITAMINA D.....	121
5.6.1. CORRELACIÓN DE VALORES DE VITAMINA D CON MARCADORES INMUNOLÓGICOS.....	122
5.6.2. CORRELACIÓN DE VALORES DE VITAMINA D CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA.....	122
CAPITULO 6: DISCUSIÓN.....	123
6.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS CASOS DE PROCTOCOLITIS	126
6.2. INTERPRETACION DE HALLAZGOS INMUNOFENOTÍPICOS DE LA PROCTOCOLITIS ALÉRGICA.....	130
6.2.1. ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS TOTALES (INMUNIDAD ADQUIRIDA).....	130
6.2.2. ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS T CD4+.....	131
6.2.3. ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS B.....	132
6.2.4. ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS.....	134
6.2.5. ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES MIELOIDES (INMUNIDAD INNATA).....	136
6.2.6. ANÁLISIS DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE CITOQUINAS.....	141

6.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA PROCTOCOLITIS ALÉRGICA TRAS LOS HALLAZGOS OBSERVADOS	144
6.4. ESTUDIO DE PACIENTES SEGÚN EL SCORE CLÍNICO.....	146
6.5. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LOS PACIENTES SEGÚN EL TRATAMIENTO RECIBIDO PARA LA PROCTOCOLITIS ALÉRGICA	146
6.6. EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DEL FENOTIPO INMUNOLÓGICO.....	147
6.7. COMPARACIÓN DE HALLAZGOS INMUNOLÓGICOS DE LA PROCTOCOLITIS CON LAS ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS DE PACIENTES CON ALERGIA MEDIADA POR IGE	149
6.7.1. COMPARACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS	151
6.7.2. COMPARACIÓN DE LA FISIOPATOLOGÍA DE AMBAS REACCIONES ALÉRGICAS EN FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS.....	152
6.7.3. COMPARACIÓN DEL COCIENTE <i>Treg</i> /TEM CD4	153
6.7.4. COMPARACIÓN DE VALORES DE VITAMINA D	155
CAPÍTULO 7: APLICACIONES PRÁCTICAS Y NUEVAS LÍNEAS DE ESTUDIO	158
7.1. APLICACIONES PRÁCTICAS.....	160
7.1.1. MARCADORES DIAGNÓSTICOS DE PROCTOCOLITIS.....	160
7.1.2. MODIFICACIÓN DE LA CLASIFICACIÓN DE REACCIONES ALIMENTARIAS.....	163
7.2. PROPUESTAS DE NUEVAS LÍNEAS DE TRATAMIENTO Y ESTUDIO.	164
CAPITULO 8: LIMITACIONES DEL ESTUDIO	168
CAPITULO 9: CONCLUSIONES	172
CAPITULO 10: BIBLIOGRAFÍA	176
CAPITULO 11: ANEXOS.....	194
11.1.- ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO	196
11.2.- ANEXO 2. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS	199
11.3.- ANEXO 3. AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA.....	205
11.4. ANEXO 4. LICENCIA DE PERMISO PARA LA UTILIZACIÓN DE GRÁFICOS DEL ESTUDIO EUROPREVAL	206
11.5. ANEXO 5. LICENCIA DE PERMISO PARA LA REPRODUCCIÓN DE LA FIGURA 3.....	207

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación y características clínicas de las principales entidades de APLV no-IgE mediada.....	13
Tabla 2: Poblaciones inmunológicas (variables inmunológicas) analizadas en el estudio:.....	72
Tabla 3. Características clínicas de los pacientes con proctocolitis.....	84
Tabla 4. Hallazgos analíticos de los casos de proctocolitis en los que se realizó hemograma y bioquímica.	86
Tabla 5. Valores antropométricos de los pacientes con proctocolitis en los distintos tiempos de evolución clínica.....	88
Tabla 6. Comparación de variables clínicas de los pacientes con proctocolitis (T0 y Tres).	89
Tabla 7. Comparación de características basales (edad y género) entre proctocolitis en fase T0 y pacientes sanos del grupo control.	91
Tabla 8. Comparación de características basales entre proctocolitis en fase T0 y T resolución.....	91
Tabla 9. Comparación de características basales (edad y género) entre proctocolitis en fase T resolución y pacientes sanos del grupo control	91
Tabla 10. Comparación de porcentaje de poblaciones linfocitarias en casos de proctocolitis en distintos tiempos (T0 o T resolución) frente a controles.	92
Tabla 11. Comparación de nº absoluto de poblaciones linfocitarias en pacientes con proctocolitis en distintos tiempos (T0 o T resolución) frente a controles.....	94
Tabla 12. Comparación del porcentaje de poblaciones mieloides en casos de proctocolitis en distintos tiempos (T0 o T resolución) frente a controles.	103
Tabla 13. Comparación de nº absoluto de poblaciones mieloides en casos de proctocolitis en distintos tiempos (T0 o T resolución) frente a controles.	104
Tabla 14. Comparación de valores de citoquinas en casos de proctocolitis en distintos tiempos (T0 o T resolución) frente a controles.	111

Tabla 15. Correlación de las células T reguladoras con el resto de poblaciones celulares.....	113
Tabla 16. Correlación de variables clínicas e inmunológicas con el score clínico propuesto en la proctocolitis alérgica.	118
Tabla 17. Evolución clínica de los pacientes según el tratamiento recibido.....	120
Tabla 18. Estudio de correlación de poblaciones inmunológicas con la evolución clínica de casos de proctocolitis.	121
Tabla 19. Comparación de valores de Vitamina D ($\mu\text{g/L}$) de pacientes con proctocolitis en T0 frente a controles sanos.	121
Tabla 20. Correlación de marcadores inmunológicos con los valores de Vitamina D.....	122
Tabla 21. Correlación entre edad de T1 y T2 con los valores de Vitamina D.	122
Tabla 22. Comparación de características clínicas de los pacientes del estudio con las referidas la publicación de Nowak et al(14).	127
Tabla 23: Comparación de resultados de células inmunológicas en pacientes con APLV-IgE mediada(162) con los resultados de los pacientes con proctocolitis de nuestro estudio.....	150
Tabla 24. Comparación de diferencias entre casos de APLV-IgE mediada(162), proctocolitis y sus controles; respecto a valores de Vitamina D.	155
Tabla 25. Estudios de calprotectina fecal como marcador diagnóstico de enterocolitis inducida por proteínas de leche de vaca.....	161

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Incidencia ajustada de alergia a proteína de leche de vaca a lo largo de 2 años. Estudio Europrevall (licencia de permiso de utilización en anexo 10.4)	11
FIGURA 2: Edad de introducción de proteínas de leche de vaca e incidencia acumulada de APLV del estudio EuroPrevall (licencia de permiso de utilización en anexo 10.4).	27
FIGURA 3: Esquema de las principales respuestas inmunológicas (innata y adaptativa) y sus componentes celulares.....	28

FIGURA 4: Tipos de linfocitos T según las fases de la respuesta inmunológica.	35
FIGURA 5: Esquema de respuesta inmunológica mediada por células T CD4+ en el que se resumen los subgrupos celulares, citoquinas que median su diferenciación (flecha) y sus funciones.....	36
FIGURA 6: Interacciones de la Vitamina D en las diferentes poblaciones inmunológicas.	39
FIGURA 7: Resumen de la secuencia de reacciones de hipersensibilidad inmediata propia de las alergias IgE mediadas.	40
FIGURA 8: Esquema de las patologías producidas por una alteración en el equilibrio del sistema inmunológico.	43
FIGURA 9: Esquema de manejo de muestras biológicas y análisis de poblaciones celulares en el Laboratorio de Inmunorregulación.....	66
FIGURA 10: Esquema de la metodología del estudio.....	75
FIGURA 11. Esquema del cronograma del estudio	76
FIGURA 12: Reclutamiento de pacientes del grupo control (sanos).....	83
FIGURA 13. Reclutamiento de pacientes de grupo proctocolitis.....	84
FIGURA 14. Tipos de tratamiento de exclusión de proteínas de leche de vaca administrado en los pacientes con proctocolitis.	87
FIGURA 15. Mediana de tiempo de resolución de la sintomatología tras la introducción de tratamiento.	88
FIGURA 16. Comparación de poblaciones linfocitarias según grupos de pacientes.	96
FIGURA 17. Comparación del porcentaje de células TCD4+ según grupos de pacientes.....	97
FIGURA 18. Comparación del nº absoluto de células TCD4+ según grupos de pacientes.....	98
FIGURA 19. Comparación del porcentaje de células B según grupos de pacientes.	99
FIGURA 20. Comparación de células B reguladoras según grupos de pacientes.	100
FIGURA 21. Gráfico de células T-reguladoras según grupos de pacientes.....	101

FIGURA 22. Gráfico de células Treguladoras (Foxp3+) según grupos de pacientes.....	102
FIGURA 23. Relación entre células Treg y TCD4+ TemRA según grupos de estudio.....	102
FIGURA 24. Gráfico de poblaciones mieloides: granulocitos, neutrófilos y eosinófilos según grupos de estudio.	106
FIGURA 25. Análisis de la población de basófilos en los distintos grupos de pacientes.	107
FIGURA 26. Análisis de células dendríticas según grupos de estudio.....	109
FIGURA 27. Análisis de monocitos según grupos de estudio.	109
FIGURA 28. Análisis de células NK según grupos de estudio	110
FIGURA 29. Análisis de células productoras de citoquinas.	112
FIGURA 30. Curva ROC del porcentaje de células CD4 RTE	115
FIGURA 31: Curva ROC del porcentaje de células NK16+56-.....	115
FIGURA 32. Curva ROC del nº absoluto de células NK16+56-	116
FIGURA 33. Curva ROC del porcentaje de granulocitos.....	116
FIGURA 34. Curva ROC del nº absoluto de granulocitos	117
FIGURA 35. Resumen de hallazgos inmunofenotípicos de nuestro estudio de proctocolitis	145
FIGURA 36. Comparación de células T CD4+ productoras de IL-4 en pacientes con APLV-IgE mediada o CMPA (A)(162) con pacientes con proctocolitis no-IgE mediada de nuestro estudio(B).	151
FIGURA 37. Comparación de resultados de nº absoluto de T-reg en pacientes con APLV-IgE mediada o CMPA (A) frente a pacientes con proctocolitis aguda de nuestro estudio (B).	152
FIGURA 38. Fisiopatología de proctocolitis no-IgE mediada tras resultados de este estudio.	153
FIGURA 39. Comparación de cociente Treg/TEM CD4 en pacientes con alergia mediada por IgE a huevo del estudio Fuentes-Aparicio (A) con los pacientes con proctocolitis alérgica.....	154



RESUMEN Y ABSTRACT

RESUMEN

TITULO DE LA TESIS

PAPEL DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS EN LA ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA NO MEDIADA POR IGE EN LA INFANCIA.

INTRODUCCIÓN

La fisiopatología de la alergia a proteínas de leche de vaca (APLV) no mediada por IgE es desconocida lo cual explica la falta de marcadores diagnósticos y pronósticos para esta entidad con un posible sobre diagnóstico. En el momento actual su incidencia está en aumento lo que conlleva un aumento de recursos sanitarios. Los estudios previos en alergias no mediadas por IgE, principalmente en enterocolitis alérgica, sugerían un mecanismo mediado por células T sin llegar a confirmarse en estudios posteriores.

OBJETIVOS

El objetivo del estudio es investigar los mecanismos inmunológicos, en especial el papel de las células T reguladoras (Treg), implicados en la fisiopatología de la proctocolitis alérgica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo observacional realizado en un hospital terciario, desde enero de 2014 a enero de 2019, de lactantes con proctocolitis alérgica diagnosticados en consultas de Digestivo Infantil. Se recogieron variables clínicas y analíticas hasta la adquisición de tolerancia, poblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo en sangre periférica en dos tiempos ("T0" en fase aguda o "Tres" en la resolución) y niveles de vitamina D. Se compararon las variables con un grupo control de lactantes sanos de edades similares. Se realizó estudio bivariante y curvas ROC, considerándose significativo una $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se reclutaron 32 pacientes con proctocolitis (22 en T0 y 10 en Tres) y 10 controles sanos. Las características clínicas (edad y género) de estos grupos eran

comparables. En el análisis de poblaciones linfocitarias, no se observan marcadas diferencias en las principales poblaciones celulares excepto mayores recuentos de células T-CD4 memoria, valores aumentados de células B reguladoras y un mayor porcentaje de células Treg en pacientes con proctocolitis aguda respecto a controles. En el análisis de poblaciones mieloides se encuentran elevados de forma estadísticamente significativa los niveles de granulocitos (fundamentalmente eosinófilos), células dendríticas (mDC2) y células NK16+56- en pacientes con proctocolitis respecto a los controles. Los marcadores inmunofenotípicos que muestran mejor capacidad diagnóstica de proctocolitis según curvas ROC son el número absoluto de células NK16+56- y el número de granulocitos. No hay diferencias en los valores plasmáticos de Vitamina D en los pacientes con proctocolitis respecto al grupo de controles sanos de la misma edad a diferencia de lo que ocurre en la alergia mediada por IgE.

CONCLUSIONES

En la proctocolitis alérgica no se observa una deficiencia de células Treg, como sí ocurre en la APLV mediada por IgE, que explique la fisiopatología de la enfermedad. La ausencia de diferencias relevantes en la población de células T con respecto a controles sanos va a favor de una escasa participación de la inmunidad adaptativa en la proctocolitis alérgica y, por tanto, no parece deberse a una respuesta mediada por células T. El mecanismo fundamental que define el proceso inflamatorio en la proctocolitis alérgica podría relacionarse más con la inmunidad innata del huésped que con la respuesta T-CD4, caracterizado por un aumento de células NK16+56-, eosinófilos y células dendríticas (mDC2). Éstos podrían evaluarse como posibles marcadores diagnósticos de APLV no mediada por IgE.

PALABRAS CLAVE

Alergia a las proteínas de leche de vaca, alergia a la leche de vaca no mediada por IgE, proctocolitis alérgica, alergia alimentaria, células T reguladoras.

ABSTRACT

TITLE

THE ROLE OF REGULATORY T CELLS IN NON-IGE MEDIATED COW`S MILK ALLERGY IN CHILDREN

INTRODUCTION

The pathophysiology of non-IgE mediated cow`s milk allergy is unknown. That explains the lack of diagnostic and predictive markers for this entity with a possible over diagnosis. Actually, the incidence is increasing and so it does the cost of health expenditure. Previous studies in non-IgE mediated cow`s milk allergy, especially the ones that study allergic enterocolitis, suggested a mechanism mediated by T cells, but without confirmation in subsequent studies.

OBJECTIVE

The aim of this study is to investigate de immunological mechanisms, especially the role of regulatory-Tcells (Treg) involved in the pathophysiology of allergic proctocolitis.

METHODS

A prospective observational study was conducted in a tertiary hospital, including infants diagnosed with allergic proctocolitis in Infant`s Digestive consults. This study was conducted between January 2014 and January 2019. Clinical and analytical variables were collected until the infants acquired tolerance to cow`s milk proteins. These variables were compared with a control group of healthy infants with similar ages. The main analytical variables were lymphocyte populations, included T regulatory cells, extracted from peripheral blood and processed immediately by flow cytometry, in two times of the study: first one ("T0") in acute phase and second one ("Tres") in the clinical resolution. Levels of Vitamin D were also collected from both groups of study (proctocolitis and healthy group).

Bivariate study and ROC curves were performed, considering $p < 0.05$ as significant.

RESULTS

We enrolled 32 patients with proctocolitis (22 in *T0* phase and 10 in *Tres* phase) and 10 infants in the healthy group. Clinical characteristics as sex and age were comparable in all groups of the study. There was no marked difference between lymphocyte populations in general except a higher T-CD4 memory cell counts, an increased values of regulatory B cells and a higher percentage of regulatory T cells ($p < 0.01$) in patients with acute proctocolitis in contrast to the healthy group. In the analysis of myeloid cell population, the levels of granulocytes (mainly eosinophils), dendritic cells (mDC2) and NK16+56- cells were significantly higher in patients with proctocolitis compared to the healthy group. The immunophenotypic markers that showed a better quality to discriminate between healthy and proctocolitis infants, according to area under the ROC curves, were the absolute number of NK16+56- cells and the number of granulocytes. There were no differences in vitamin D values in patients with proctocolitis compared to healthy infants of the same age, in contrast to IgE mediated allergy studies, which reveals low values of this vitamin D.

CONCLUSIONS

We haven't found a deficiency of T regulatory cells that explains the pathophysiology of allergic proctocolitis, as it occurs in previous studies of IgE-mediated cow's milk allergy. The absence of relevant differences in T cell population compared to healthy controls reveals a low participation of adaptive immunity in proctocolitis. Therefore, allergic proctocolitis seems not to have an immune mechanism mediated by T cells, but it could be related to innate immunity characterized by an increase in NK16+56- cells, eosinophils and dendritic cells. These cells could be evaluated in future studies as possible markers of non-IgE mediated cow's milk protein allergy.

KEYWORDS: cow's milk protein allergy, non-IgE-mediated cow's milk allergy, allergic proctocolitis, food allergy, regulatory T cells.



ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

IgE: inmunoglobulina E

APLV: alergia a proteínas de leche de vaca

APLV-IgE mediada: alergia a proteínas de leche de vaca mediada por IgE

APLV-no IgE: alergia a proteínas de leche de vaca no mediada por IgE

PLV: proteína de leche de vaca

FPIES: Food protein-induced enterocolitis syndrome o enterocolitis inducida por proteína alimentaria.

FPIAP: Food protein-induced allergic proctocolitis o proctocolitis alérgica.

FPE: Enteropatía alérgica. Actualmente también denominado FPIES crónica.

HePLV: Hidrolizado extenso de proteína de leche de vaca

HePLV con PB: Hidrolizado extenso de proteína de leche de vaca con probióticos

HePLV sin PB: Hidrolizado extenso de proteína de leche de vaca sin probióticos.

eHF: Fórmula elemental

ESPGHAN: European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica.

AAP: Academia Americana de Pediatría

CPF: calprotectina fecal

EDN: endotoxina derivada del neutrófilo

Poblaciones células inmunológicas:

Treg: células T reguladoras

Breg: células B reguladoras

RTE: células T recién salidas del timo (recent thymic emigrants).

Naïve: son células vírgenes que no han sido expuestas a antígenos.

Act: son células activadas recientemente en respuesta a un antígeno específico.

EMem: células “efectoras-memoria” productoras de citoquinas y que realizan su función efectora.

CMem: células “memoria-central” que constituyen el pool de células de memoria.

TemRA: células efectoras muy diferenciadas, pero de vida media muy corta. Pueden reflejar una respuesta inmune intensa en un periodo reciente.

NK: célula natural killer.

mDC: células dendríticas mieloides.

IL: interleuquina

Th0: células T que no se han diferenciado aún en Th1, Th2 o Th17.

Th: Células T helper

IL: interleuquina

TNF α : factor de necrosis tumoral-alfa

IFN γ : interferon-gamma



CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

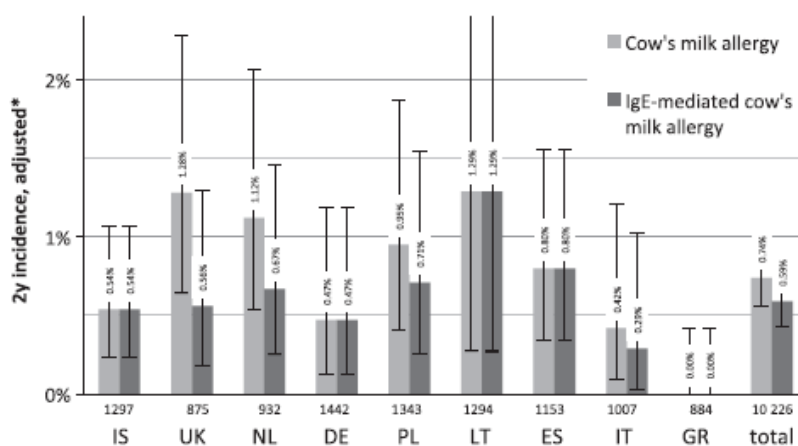
1.1. ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA

1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de las reacciones alérgicas está aumentando de forma exponencial en los países desarrollados(1). Respecto a las alergias alimentarias, se estima una prevalencia hasta del 8% (en EEUU) de alergia alimentaria en niños menores de 3 años(2). En España se estima que 1 de cada 10 niños menores de 4 años desarrollarán una alergia alimentaria según el estudio Alergológica de 2005(3). Dentro de ellas, las alergias a la proteína de leche de vaca (APLV) ocupan el primer puesto de alergia alimentaria en la infancia, con una prevalencia del 2.2%(2), de un 3-5% en lactantes alimentados con fórmula láctea y un 0.5% en aquellos alimentados con lactancia materna(4).

En el estudio EuroPrevall de 2015(5) que analiza una cohorte de recién nacidos de nueve países Europeos (incluida España), la incidencia de APLV confirmada fue de 0.54% en los primeros dos años de vida. Dentro de ellos, el 23.6% tenían una alergia no-IgE mediada. En España, se observa una incidencia de APLV a lo largo de 2 años del 0.8% (Figura 1).

FIGURA 1: Incidencia ajustada de alergia a proteína de leche de vaca a lo largo de 2 años. Estudio Europrevall (licencia de permiso de utilización en anexo 10.4)



1.1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES ALÉRGICAS

El espectro de manifestaciones clínicas secundarias a alergia a PLV es muy amplio pudiendo ocasionar(6):

- 1- Reacciones mediadas por IgE: alergia inmediata tipo I (mediada por mastocitos) con manifestaciones sistémicas, respiratorias, cutáneas, digestivas o síndrome de alergia oral.
- 2- Reacciones no mediadas por IgE(7): enterocolitis inducida por proteínas de alimentos (FPIES aguda), proctocolitis alérgica (FPIAP), enteropatía (FPIES crónica o FPE), enfermedad celiaca, anemia ferropénica inducida por proteína de leche de vaca, dermatitis de contacto y dermatitis herpetiforme y síndrome Heiner o hemosiderosis pulmonar. Son reacciones de tipo IV mediada por mecanismos celulares.
- 3- Reacciones mixtas IgE/no mediadas por IgE: esofagitis eosinofílica, gastritis alérgica eosinofílica o gastroenterocolitis alérgica eosinofílica.

Las reacciones IgE mediadas son las que resulta más fácil su diagnóstico dado que en general tienen confirmación con la detección de la IgE específica en suero (InmunoCAP) o en la epidermis (pruebas cutáneas o PRICK test)(8). Sin embargo, en las reacciones no IgE mediadas y las mixtas estas pruebas resultan negativas por lo que suponen un reto diagnóstico para el pediatra.

1.1.3. ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA NO MEDIADAS POR IgE

Su prevalencia está en aumento estimándose hasta el 60% de todas las reacciones por alergia a proteínas de leche de vaca. El estudio Europreval de 2015 no consiguió estimar su prevalencia real en parte por la falta de criterios diagnósticos comunes hasta 2017 por lo que son necesarios más estudios epidemiológicos(9).

Se caracterizan por un periodo de latencia mayor entre la ingesta de PLV y el inicio de la sintomatología. Se postula que son reacciones tipo IV, mediadas por células T, aunque su mecanismo inmunopatológico es aún desconocido(10). Suelen aparecer en el primer mes de vida con resolución espontánea alrededor

de los 2 años. Producen manifestaciones gastrointestinales variables y pueden repercutir en el estado nutricional del paciente(11)(12).

Dentro del grupo de reacciones alérgicas por ingesta de proteína de leche de vaca no-IgE mediadas distinguimos distintas entidades clínicas(13),(14),(15),(8),(16),(17) (tabla 1):

1. FPIES aguda o Enterocolitis inducida por proteínas
2. FPIAP o Proctocolitis alérgica inducida por proteínas
3. FPE o FPIES crónica o Enteropatía inducida por proteínas
4. Otras: anemia ferropénica inducida por PLV, formas atípicas de presentación o síntomas menores de alergia alimentaria. Algunos autores incluyen en este grupo la enfermedad celiaca.

Tabla 1: Clasificación y características clínicas de las principales entidades de APLV no-IgE mediada.

	ENTEROCOLITIS o FPIES	PROCTOCOLITIS o FPIAP	ENTEROPATÍA
Edad de inicio	1 día-1 año	Días- 6 meses	Hasta los 2 años
Descartar otras alergias alimentarias	40% con la soja	20% con soja o alergia múltiple	Raro
Alimentación del paciente	FA	Lactancia materna 60% o FA	FA
Antecedentes atopia			
- AF	40-70%	25%	desconocido
- AP	30%	20%	22%

	ENTEROCOLITIS o FPIES	PROCTOCOLITIS o FPIAP	ENTEROPATÍA
SÍNTOMAS			
Vómitos	Predominante	No	Intermitente
Diarrea	Grave	Leve	Moderado
Rectorragia	Grave	Predominante	Raro
Edema	Grave	Infrecuente	Moderado
Shock	15%	No	No
Fallo crecimiento	Moderado	No	Moderado
LABORATORIO			
Anemia	Moderada	Infrecuente	Moderada
Hipoalbuminemia	Aguda	Infrecuente	Moderada
Metahemoglobinemia	+/-	No	No
Acidosis	+/-	No	No
PRUEBAS ALÉRGICAS			
Prick test	Negativo*	Negativo	Negativo
InmunoCAP	Negativo*	Negativo	Negativo
IgE total	Normal/elevado	Normal/elevado	Normal
Eosinofilia periférica	No	Ocasional	No

	ENTEROCOLITIS o FPIES	PROCTOCOLITIS o FPIAP	ENTEROPATÍA
BIOPSIA INTESTINAL:			
Atrofia vellosidades	Parcheado	No	No
Colitis	Importante	Focal	No
Erosión mucosa	Ocasional	Ocasional	No
HNL	No	Común	Duodeno/colon
Infiltrado eosinófilos	Importante (abscesos crípticos)	Importante (abscesos crípticos)	Poco
PRUEBA DE PROVOCACIÓN	Vómitos a las 3-4 horas y diarrea a 5- 8 horas	No necesaria	Vómitos o diarrea a las 24- 72 horas
TRATAMIENTO			
Tipo	HPLV	Dieta materna \neq o HPLV	HPLV
Respuesta	80%. Mejoría en 3- 10 días	Mejoría en 48-96 horas. 10% persiste	En 1-3 semanas
Prueba tolerancia (reintroducción PLV)	1.5-2 años	12 meses	1-2 años con biopsia

(FA: fórmula adaptada, AF: antecedentes familiares, AP: antecedentes personales, HNL: hiperplasia nodular linfoide; PLV: proteína de leche de vaca. HPLV: Hidrolizado extenso de proteína de leche de vaca; \neq Dieta materna retirando PLV en la dieta de la madre; *: si es positivo, puede ser factor de riesgo de alergia persistente,)

1.1.3.1. SÍNTOMAS MENORES DE ALERGIA o FORMAS ATÍPICAS

Además de estos tres principales grupos definidos en la literatura y en las guías de práctica clínica existe un grupo comúnmente denominado como “síntomas menores de alergia o formas atípicas” que, si bien no cumple ninguna de las definiciones propuestas para las cuatro entidades anteriores, se comportan como reacciones no IgE mediadas producidas por PLV. Algunos autores no los

considera dentro de la clasificación de alergia no mediada por IgE puesto que no se ha encontrado un mecanismo inmunológico específico pero se diagnostican igualmente con la prueba de retirada-reexposición(18).

Los síntomas menores de alergia son inespecíficos: irritabilidad con llanto, reflujo, estreñimiento, rinitis/estornudos/tos, dermatitis de repetición(15). Se creen que podrían ser secundarios a alteraciones de la motilidad tras la interacción entre el sistema nervioso entérico y mediadores inflamatorios liberados por eosinófilos o mastocitos tras ser activados por la exposición al alérgeno en cuestión(4),(19).

Los síntomas gastrointestinales como las regurgitaciones, cólicos infantiles, estreñimiento son muy frecuentes en el periodo de lactancia. La mayoría de estos trastornos suelen ser funcionales y transitorios definidos por los criterios Roma IV(20)(21), con una prevalencia según el trastorno entre 20-60% en la infancia. Sin embargo, en algunos pacientes estos síntomas se deben a alergia a PLV no IgE mediada, descubierto fundamentalmente por la mejoría de la sintomatología en los niños cuando se trataba como una APLV con cambio a una fórmula hidrolizada. Algunos autores publicaron en 2015 algoritmos o scores clínicos que permitían saber cuándo sospechar que esta sintomatología es debida a un mecanismo alérgico y no funcional(4),(22). Los propios autores advierten que estos algoritmos están basados en el consenso de expertos clínicos más que en la evidencia científica ante la falta de literatura que revele el mecanismo fisiopatológico por el que se produce esta reacción alérgica no IgE mediada en el lactante. Las pruebas de laboratorio IgE específicas como el InmunoCAP, prick test o los parches tampoco son útiles en estas entidades.

La elevada prevalencia de estos trastornos gastrointestinales y la falta de conocimiento sobre la fisiopatología involucrada en ellos han conducido a una sobreestimación del diagnóstico de alergia a proteína de leche de vaca y un aumento de prescripciones de dietas de eliminación de PLV en estos pacientes. Esto tiene repercusión tanto en el crecimiento del lactante como en la economía de la familia y de la sociedad. Por ello se propuso un score clínico "Cow's Milk Related Symptom Score" o CoMiSS en 2015 que pretende facilitar el diagnóstico de alergia a PLV en estos casos(22),(23),y cuyo protocolo para validación se ha

publicado recientemente(24). Los resultados finales de sensibilidad y especificidad para esta herramienta diagnóstica están pendientes de publicación. Este tipo de test diagnóstico no tiene validez para la proctocolitis alérgica ni para el resto de entidades no-IgE mediadas, sólo se aplica para los síntomas menores o atípicos.

El score clínico CoMiSS se basa en 5 ítems (llanto, regurgitación, deposiciones, síntomas cutáneos y síntomas respiratorios) con una puntuación final de 0-33 puntos. Si el paciente obtiene más de 12 puntos en el score CoMiSS, la sintomatología es probable que se deba a una alergia a PLV con un valor predictivo positivo del 80%. En estos pacientes será en los que se realice la prueba de retirada de proteínas de leche de vaca en la dieta durante 2-4 semanas y estará indicado realizar un test alérgico (InmunoCAP) según las guías(25), para descartar un mecanismo IgE mediado y por tanto una reacción inmediata en futuras provocaciones orales o para definir el pronóstico clínico. Por el contrario, si la puntuación inicial es menor de 12 puntos entonces es poco probable que la sintomatología menor o atípica se deba a alergia a proteínas de leche de vaca sino más bien a un trastorno funcional del lactante evitándonos en estos pacientes tener que realizar cambios en la alimentación.

1.2. PROCTOCOLITIS ALÉRGICA

1.2.1. DEFINICIÓN Y CUADRO CLÍNICO

La proctocolitis alérgica es un proceso de hipersensibilidad a proteínas ajenas al organismo no mediado por IgE. Es una patología transitoria y benigna que habitualmente comienza en un lactante entre 1-4 meses de vida. A pesar de que su prevalencia e historia natural no están claramente descritas, parece presentar una incidencia en aumento en los últimos años en nuestro medio, incluso en los lactantes alimentados únicamente con lactancia materna. Supone la causa más frecuente de colitis en el niño menor de un año con una prevalencia del 18 al 64% de causa de sangrado rectal en un lactante(7),(26),(27). Puede asociarse a eccema (en un 22% de casos) y antecedentes familiares de atopia (hasta en un 25% de casos). Otros alimentos implicados a parte de las proteínas de leche de vaca son la soja (30%), huevo, trigo y el maíz(7).

Se describió por primera vez por Lake et al en 1892 en seis lactantes amamantados con lactancia materna exclusiva con sangrado rectal en su primer mes de vida(28).

El cuadro clínico consiste en sangrado rectal sin alteración del estado general ni en la curva de peso en un lactante sano. El sangrado rectal suele estar mezclado con las deposiciones, que a su vez suelen ser mucosas y más blandas. En ocasiones se encuentran fisuras anales en la exploración física. En la mayoría de los casos las pruebas analíticas son normales, pero puede encontrarse eosinofilia, anemia e hipoalbuminemia leves. Otras manifestaciones clínicas asociadas pueden ser el meteorismo (30% casos), vómitos ocasionales (27%) y dolor abdominal (20%)(7). Algunos pacientes muestran niveles elevados de anticuerpos IgE y antecedentes familiares de atopia. El inicio de la sintomatología puede ser aguda (en las primeras 12 horas de la ingesta de PLV) pero es más frecuente que sea insidiosa con un intervalo de latencia más prolongado. El diagnóstico por tanto suele ser clínico, con resolución de la sintomatología, habitualmente en las primeras 96 horas de la exclusión de PLV en la dieta del lactante o de la madre (en el caso de lactancia materna exclusiva) y tras descartar otras causas de sangrado rectal. Las pruebas de InmunoCAP y PRICK test son negativas. La colonoscopia no suele ser necesaria para el diagnóstico habiéndose descrito eritema de la mucosa rectosigmoidea con hiperplasia nodular e infiltrado eosinofílico en el estudio histológico(7). El tratamiento consiste en la exclusión de las PLV de la dieta, aunque hasta en un 20% de casos de lactantes con lactancia materna exclusiva suele resolverse espontáneamente sin tratamiento(25),(26).

Se han descrito múltiples proteínas capaces de producir proctocolitis, estando presente en casi todos los casos la proteína de leche de vaca (PLV). Las PLV son capaces de producir patología incluso en los pacientes alimentados con lactancia materna, que representan el 60% de los casos de proctocolitis, debido a que se excretan parcialmente proteínas de leche de vaca a través de la leche materna(7)(29). En estos casos la clínica de inicio suele ser más tardía y leve.

El 30-40% de los pacientes presentan una alergia combinada para proteínas de leche de vaca y soja por lo que no se recomienda el tratamiento con fórmulas de soja en menores de 6 meses.

1.2.2. DIAGNÓSTICO DE PROCTOCOLITIS ALÉRGICA.

1.2.2.1. GUÍAS DE PRÁCTICA CLÍNICA

Según las guías de práctica clínica de alergia a proteínas de leche de vaca(25), no existe ningún estudio de laboratorio que pueda apoyar el diagnóstico de proctocolitis alérgica. Éste se basa en la historia clínica compatible y la desaparición de la sintomatología tras 72-96 horas de la retirada de las proteínas mediante la administración de una fórmula con hidrolizado de proteínas(14),(30),(31). Dado que la clínica en algunos casos es poco clara y puede solaparse con otras patologías digestivas (infecciosas, malabsorción...) el diagnóstico puede demorarse retrasándose el inicio del tratamiento o, por el contrario, realizarse tratamientos innecesarios(25),(26).

En el diagnóstico diferencial de la proctocolitis alérgica habría que descartar otras causas de rectorragia en el lactante menor de un mes como son: enterocolitis necrotizante, sepsis, enfermedad de Hirschprung, invaginación intestinal o vólvulo, enterocolitis alérgica (FPIES), fisura anal, dermatitis perianal, infecciones gastrointestinales (*Salmonella*, *shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia* o parasitosis), coagulopatías o deficiencia de vitamina K. La exclusión de estas patologías suele realizarse con una historia clínica y exploración clínica completa por lo que no suele ser necesario la realización de exploraciones complementarias intervencionistas para el diagnóstico de proctocolitis alérgica(14).

Actualmente existen cuatro Guías de Práctica Clínica que abarquen el diagnóstico y manejo de la proctocolitis alérgica, así como de otras alergias no-IgE mediadas. Las principales aportaciones sobre el diagnóstico y manejo de proctocolitis alérgica son las siguientes:

1. Guía Europea ESPGHAN (sobre el diagnóstico y manejo de la alergia a proteínas de leche de vaca 2012).(25)

El algoritmo diagnóstico para la alergia a proteínas de leche de vaca no IgE mediada propuesto por la ESPGHAN incluye una dieta de eliminación diagnóstica de 1-2 semanas para las reacciones tempranas y tardías como vómitos o dermatitis atópica y de 2 a 4 semanas para los síntomas gastrointestinales menores como la diarrea o el estreñimiento. Si hay una mejoría clínica está indicado la realización de una prueba de provocación oral. En el caso de que ésta sea positiva se continuará con la dieta de exclusión de proteínas de leche de vaca. Si el paciente no presenta mejoría de la sintomatología tras la dieta de eliminación diagnóstica o la prueba de provocación resulta negativa, entonces el paciente se descarta la alergia no mediada por IgE y se retira la dieta de eliminación.

En las reacciones inmediatas de tipo I o IgE mediadas se debe realizar una dieta de eliminación de PLV y realizar pruebas alérgicas para la determinación de IgE específica (InmunoCAP o PRICK test). Si éste resultara positivo se confirma APLV-IgE mediada y se continúa con la dieta de eliminación. Si las pruebas alérgicas son negativas entonces se realizaría la provocación oral y según su resultado se confirma o se descarta alergia.

La endoscopia digestiva estará indicada en aquellos pacientes con sintomatología gastrointestinal inexplicada o persistente a pesar de la retirada de las proteínas de leche de vaca, retraso ponderoestatural o anemia ferropénica. Sin embargo, los hallazgos encontrados de atrofia o infiltrados eosinofílicos no son específicos ni patognomónicos y por tanto tendrán que correlacionarse con la clínica.

No están indicados los parches ni los test intradérmicos en el diagnóstico de alergia alimentaria a proteínas de leche de vaca.

Esta Guía hace referencia a la necesidad de una guía específica sobre alergias a proteínas de leche de vaca no-IgE mediada. En pacientes con “síntomas menores o atípicos” de alergia alimentaria no-IgE mediada no se recomienda realizar pruebas de alergia de forma sistemática de entrada dado que no es coste efectivo. Sin embargo, si tras realizar una prueba de retirada de PLV los síntomas menores o atípicos mejoran entonces sí se recomienda realizar

pruebas de alergia para descartar la probable reacción inmediata al reintroducir el alérgeno y ofrecer un pronóstico al paciente. Si la IgE específica es negativa se debe considerar el diagnóstico de alergia no-IgE mediada, intolerancia a PLV no inmunológica o incluso deficiencia de lactasa secundaria.

2. Guía Americana para el diagnóstico y manejo de la alergia alimentaria de 2010: “Guidelines for The Diagnosis and Management of Food Allergy in The United States”(32)

En esta guía se define la Proctocolitis alérgica o FPIAP de acuerdo a los criterios sugeridos por la EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology) sobre alergia alimentaria. El criterio diagnóstico fundamental es la mejoría de la sintomatología tras la eliminación del alérgeno de sospecha implicado en la sintomatología y la recurrencia de la sintomatología tras la prueba de provocación con dicho alérgeno(32).

3. Guía inglesa BSACI (British Society for Allergy and Clinical Immunology) para el diagnóstico y manejo de la alergia alimentaria 2014(33).

Define el cuadro clínico como la colitis en un lactante sano, feliz, con crecimiento normal, alimentado al pecho con la única sintomatología de moco y sangre en heces que se resuelve tras la retirada, habitualmente a las 48 horas de las proteínas de leche de vaca en la dieta materna y que se resuelve alrededor del año de vida. La endoscopia no es necesaria para el diagnóstico, pero si se realizara para descartar otra patología se observaría infiltrado eosinofílico y colitis distal.

4. Guía NICE de alergia alimentaria 2011(34)

El diagnóstico está basado en la historia clínica compatible, prueba de eliminación del alérgeno sospechoso (2-6 semanas) y reintroducción posterior. No se recomiendan otras pruebas alérgicas como IgE específica o InmunoCAP, prick test, patch test (parches) en las alergias no mediadas por IgE.

En ellas también se basan las guías de atención primaria en Reino Unido para el manejo de las alergias no mediadas por IgE(35),(36).

5. Nowak 2017. Guía internacional de consenso sobre diagnóstico y manejo de FPIES (enterocolitis inducida por proteínas de leche de vaca)(37).

En esta guía, recientemente publicada aparece por primera vez unos criterios diagnósticos claros para la enterocolitis inducida por PLV o FPIES. Sin embargo, no introduce cambios en el diagnóstico de proctocolitis alérgica o FPIAP por lo que el diagnóstico sigue basándose en el cuadro clínico característico y la mejoría de la sintomatología tras la retirada de PLV en la dieta.

El motivo de centrarse en las FPIES es que hasta ahora el cuadro clínico resultaba difícil de diagnosticar en la práctica clínica, en parte porque simula patologías graves que cursan también con shock hipovolémico (deshidratación por gastroenteritis aguda, sepsis), enfermedades metabólicas o enterocolitis necrotizante. La guía hace referencia a la fisiopatología de las FPIES explicando que se debe a una inflamación de la mucosa intestinal, debidas a la ingesta de PLV o soja, de origen inmunológico mediado por células T y citoquinas proinflamatorias (IL 8 y triptasa) que conducen al aumento de la permeabilidad intestinal. Como consecuencia de ello se produce la pérdida de líquidos y el cuadro típico de vómitos, diarrea y shock hipovolémico.

La Guía Nowak define por primera vez unos criterios diagnósticos sólo para las FPIES agudas o enterocolitis. Las FPIES crónicas o FPE (enteropatía por PLV) no quedan definidos y el diagnóstico continúa siendo de sospecha según el cuadro clínico expuesto en la tabla 1.

En las FPIES agudas el diagnóstico se puede realizar si el paciente tiene 1 criterio mayor (vómitos en las siguientes 1-4 horas de la ingesta de PLV sin sintomatología cutánea IgE mediada) y al menos 3 menores (letargia, palidez, necesidad de atención en urgencias, necesidad de fluidoterapia intravenosa, hipotensión, hipotermia, diarrea en las siguientes 24 horas de la ingesta, etc). En caso de dudas estará indicada la provocación que será positiva si el paciente presenta la sintomatología con al menos 1 criterio mayor y dos menores. Tras la aparición de estas guías se ha publicado recientemente en 2019 el documento de

consenso español sobre el diagnóstico de alergia a PLV no mediada por IgE que incluye estos criterios diagnósticos(38).

1.2.2.2. *PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN PROCTOCOLITIS ALÉRGICA*

Hasta el desarrollo de las distintas guías de práctica clínica anteriormente mencionadas, en los pacientes con sospecha de alergia alimentaria se realizaban una serie de pruebas diagnósticas encaminadas a descartar alergia mediada por IgE u otras causas de sangrado digestivo. Los conocimientos actuales sobre la validez de estas pruebas en la proctocolitis alérgica son los siguientes:

1. Pruebas de laboratorio. Las pruebas de laboratorio básicos como hemograma y bioquímica son normales. Es posible encontrar alteraciones leves de anemia, eosinofilia, hipoalbuminemia e hipoproteïnemia. Se han descrito casos de elevación de IgE total en ocasiones asociadas a sintomatología persistente.
2. Pruebas alergia. No se recomienda realizar test de IgE específica a PLV (InmunoCAP) por la negatividad de las pruebas, a menos que exista otras patologías asociadas como dermatitis atópica o antecedente de reacciones inmediatas. Tampoco se recomienda de rutina la realización de parches (patch tests) debido a la falta de estudios validados sobre sus resultados(39).
3. Endoscopia y biopsia. No es necesario para el diagnóstico y no está indicado de rutina salvo en pacientes con diagnóstico incierto. Si se realizara se podría encontrar infiltración de eosinófilos en la lámina propia y epitelio del colon distal formando abscesos crípticos.
4. Prueba de retirada del alérgeno. La prueba de retirada de PLV de la dieta es parte del diagnóstico de proctocolitis alérgica. En la proctocolitis la mejoría clínica tras la retirada de PLV en la dieta se suele observar a lo largo de los siguientes días hasta 4 semanas de la retirada.
5. Prueba de provocación oral (Oral food challenge): Sería la prueba gold estándar para confirmar el diagnóstico de APLV-no IgE mediada tras la mejoría clínica con la prueba de retirada. En la proctocolitis se podría realizar tras 4-8 semanas de la dieta de eliminación con carácter ambulatorio y con un diario de síntomas. Según las guías de práctica clínica de 2012, esta prueba

no suele ser necesaria realizarla para el diagnóstico de proctocolitis si el cuadro clínico es compatible y la sintomatología se resuelve tras la prueba de retirada de PLV(13). Sin embargo, las nuevas guías publicadas a partir de 2019 señalan una necesidad de confirmar la sospecha clínica con la prueba de provocación en los pacientes con proctocolitis alérgica(38).

En la actualidad, según las guías de práctica clínica(13), para el diagnóstico de proctocolitis alérgica sería suficiente con una historia clínica y exploración física completa y la prueba de retirada de PLV, siendo innecesaria la realización de otras pruebas complementarias.

1.2.3. TRATAMIENTO E HISTORIA NATURAL DE LA PROCTOCOLITIS ALÉRGICA

En el niño alimentado con lactancia materna la eliminación de las PLV en la dieta de la madre suele ser suficiente para resolver el cuadro evitando suspender la lactancia materna. En algunos casos, la rectorragia persiste a pesar de la dieta materna pudiendo ocasionar anemia ferropénica, habitualmente debida a persistencia de algún alérgeno en la dieta materna. Se han descrito casos en los que es necesario una fórmula hidrolizada de PLV o incluso elemental, consiguiendo resolver la sintomatología en 48-72 horas(14).

En el lactante alimentado con fórmula adaptada el tratamiento de primera elección es la alimentación con hidrolizados extensos de caseína(40). Las fórmulas hidrolizadas extensas de proteínas de leche de vaca (HePLV) se definen según la Academia Americana de Pediatría (AAP)(41), como aquellas que contienen péptidos, en vez de proteínas entera, con un peso molecular menor a 3000 Daltons.

Las fórmulas elementales (eHF) son aquellas que contienen únicamente aminoácidos libres en vez de proteínas. Se usan como primera línea de tratamiento en cuadros graves de enteropatía o anafilaxia sobre todo cuando se sospecha alergia múltiple. En el tratamiento de la proctocolitis alérgica, en raras ocasiones será necesario el uso de una fórmula elemental(42),(43).

Se han propuesto otras líneas de tratamiento como son las fórmulas hidrolizadas de arroz, fórmulas de soja y la adición de probióticos

(fundamentalmente *LGG* o *Lactobacillus rhamnosus*) a las fórmulas HePLV(30),(42). Las fórmulas hidrolizadas de arroz se describen en las guías(25), como una opción segura y eficiente en el manejo de la APLV, pero dada la ausencia de estudios prospectivos a largo plazo se recomienda solo en casos selectos de lactantes que rechacen o no toleren las fórmulas HePLV o en familias veganas. En estas guías también se desaconseja el uso de fórmulas de soja en menores de 6 meses dado que hasta un 10-14% de los lactantes tendrán reacciones alérgicas a este alimento. Además, tanto la ESPGHAN (European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition) como la AAP posicionan estas fórmulas de soja en un segundo lugar dado que las proteínas no son de igual valor nutricional y contienen elementos traza como fitatos o isoflavonas con desventajas nutricionales en el lactante.

En los últimos años, se está empezando a añadir ciertas cepas de probióticas añadidas a las fórmulas HePLV para el tratamiento de la APLV(4), en concreto de *Lactobacillus rhamnosus* GG (*LGG*). El estudio realizado por Berni Canani et al muestra como la adición de estos probióticos inducen la tolerancia a PLV de forma más rápida en los lactantes(44). Es un estudio prospectivo multicéntrico que comparan cinco grupos de tratamiento de pacientes con APLV en cuanto a la adquisición de tolerancia inmunológica al año de vida. Los resultados de este estudio muestran mayor tolerancia inmunológica de forma significativa en el grupo de HePLV con *LGG* comparada con HePLV sin probiótico, hidrolizado de arroz, fórmula de soja y fórmula elemental. En este estudio no se incluyeron pacientes proctocolitis ni otros casos de alergia no-IgE mediada. Los resultados de este estudio se confirmaron en ensayos clínicos posteriores(45),(46),(47).

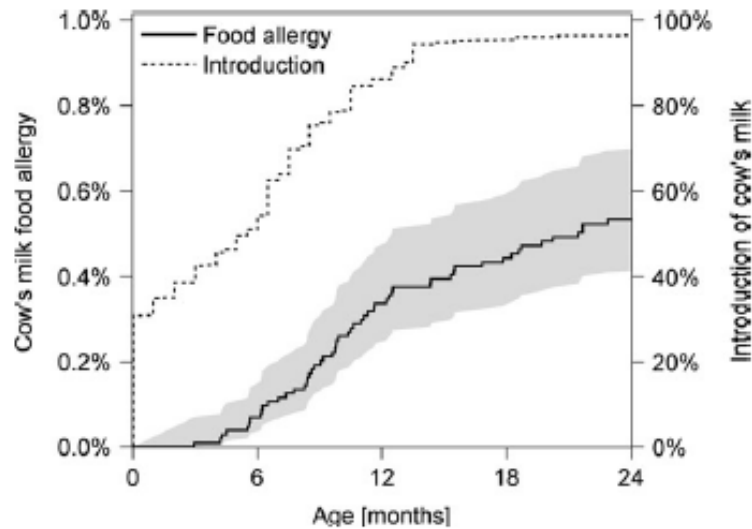
Según las guías clínicas(25), tras el diagnóstico clínico se debe mantener la fórmula hidrolizada durante al menos 6 meses o hasta los 9-12 meses de edad. La reintroducción de la alimentación con PLV en la proctocolitis alérgica podría realizarse a partir de los 6 meses pudiendo realizarse de forma gradual en domicilio con aumentos progresivos de la cantidad de fórmula artificial a lo largo de 2 semanas(14). En otras patologías no IgE mediadas más severas, como la

enterocolitis (FPIES) la dieta de eliminación se podría prolongar hasta los 18 meses de vida y debería realizarse en un medio hospitalario.

La historia natural de esta entidad es hacia la tolerancia alimentaria al año de vida(48). En el estudio EuroPrevall se observa que se adquiría la tolerancia al año en el 57% de los pacientes con APLV-IgE mediada y en el 100% de las no-IgE mediadas(5). Hasta un 20% podría resolverse de forma espontánea sin tratamiento(49). No hay descrito riesgo hacia la evolución a enfermedad inflamatoria intestinal en los estudios con seguimiento de 10 años(14) . Sin embargo, un estudio reciente parece indicar que la proctocolitis alérgica podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de trastornos gastrointestinales funcionales(50) dado que hasta el 15% de una muestra de 80 casos de proctocolitis seguidos durante 4 años desarrollaron algún trastorno digestivo funcional comparado con un grupo control sano.

El estudio de Katz et al(51), que evalúa la prevalencia, clínica e historia natural de 13.019 niños con alergia alimentaria con una incidencia de 0.34% de FPIES no mediadas por IgE, manifiesta una recuperación de hasta el 90% de los pacientes con FPIES a los 3 años de edad. Es destacable en este artículo que hasta el 18% de las alergias no mediadas por IgE se convierten en alergias mediadas por IgE con InmunoCAP o IgE específica positiva en las pruebas de alergia.

FIGURA 2: Edad de introducción de proteínas de leche de vaca e incidencia acumulada de APLV del estudio EuroPrevall (licencia de permiso de utilización en anexo 10.4).



1.3. RESPUESTA INMUNOLÓGICA Y ALERGIA ALIMENTARIA

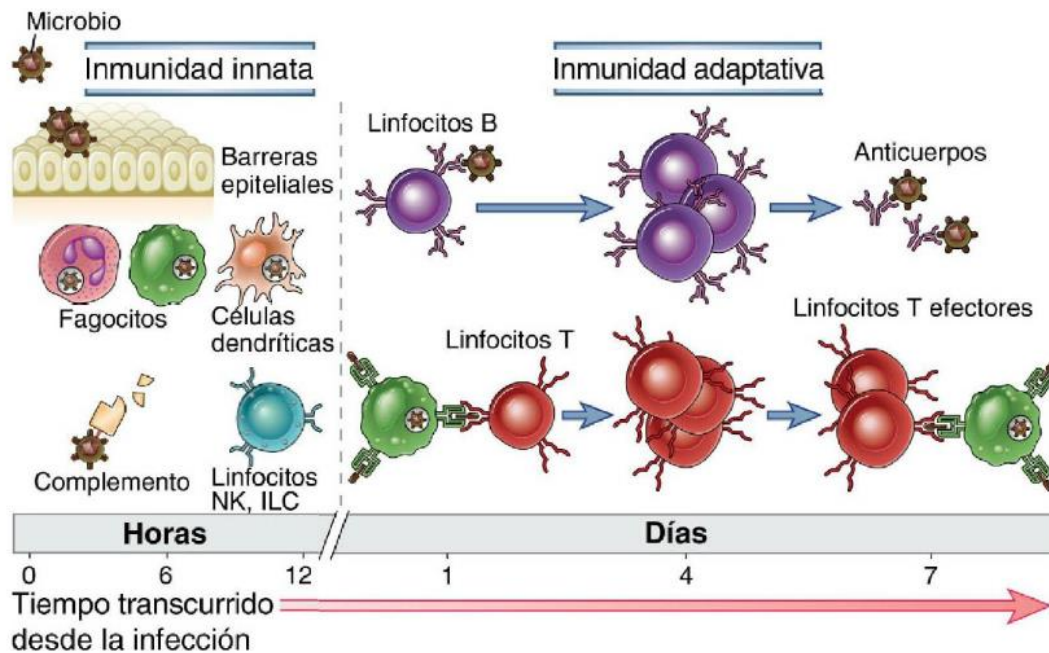
1.3.1. CONCEPTOS BÁSICOS DE INMUNOLOGÍA: INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA.

CONCEPTOS BÁSICOS

El sistema inmunitario se encarga de la defensa contra los microorganismos patógenos, y frente a sustancias extrañas o reconocidas como tal, habitualmente macromoléculas proteicas (52). También se encarga de la destrucción de las células propias tumorales, infectadas o defectuosas. Esta defensa está mediada por dos reacciones inmunológicas: una temprana o inmunidad innata, y otra tardía o inmunidad adaptativa.

El siguiente esquema resume los principales componentes de ambos tipos de respuesta (Figura 3).

FIGURA 3: Esquema de las principales respuestas inmunológicas (innata y adaptativa) y sus componentes celulares.



Extraída del capítulo 1 de Inmunología celular y Molecular. S. Abul K. Abbas.2015.

Permiso de reproducción en Anexo 5.

Todas las células del sistema inmunitario tanto innato como adaptativo secretan **citoquinas** (moléculas proteicas) que regulan y coordinan las actividades inmunológicas de éstas y por tanto expresan receptores para su reconocimiento. Algunas de ellas regulan el movimiento de células inmunitarias de la sangre a los tejidos denominándose quimiocinas.

- **Inmunidad Innata:** Es la primera línea de defensa del sistema inmunológico contra los microbios o agentes extraños por lo que su actuación es rápida gracias a células y moléculas presentes en los tejidos antes incluso de la exposición.
 - o **Componentes:** lo constituyen las barreras físicas y químicas de la piel, el epitelio de la mucosa y otras moléculas antimicrobianas. Las

células que intervienen en esta respuesta son los fagocitos (macrófagos, neutrófilos), células dendríticas, y linfocitos natural killer (NK).

- Tipos de respuesta: las dos principales reacciones son la inflamación y la defensa antivírica.
 - En la **inflamación** se reclutarán los leucocitos y proteínas plasmáticas de la sangre hacia los tejidos para destruir los microbios o sustancias extrañas.
 - La defensa antivírica está mediada por citoquinas y células NK citolíticas naturales, capaces de destruir las células infectadas para evitar la propagación del virus.
- **Inmunidad adaptativa:** Al contrario que la anterior, surge tras la exposición a la sustancia extraña y se adapta a ella por lo que actúa con alta especificidad y genera memoria inmunológica. Además de estas características, la inmunidad adaptativa tiene capacidad para la expansión clonal aumentando el número de linfocitos específicos frente a un antígeno determinado y así conseguir respuestas más eficaces. La respuesta adaptativa también dispone de mecanismos de contención o tolerancia inmunológica que son capaces de limitar la intensidad de la respuesta inmune impidiendo dañar al propio organismo por una respuesta excesiva o inadecuada.
 - Componentes: los principales componentes celulares son los linfocitos y sus productos de secreción (citoquinas o anticuerpos) además de las células presentadoras de antígenos.
 - Tipos de respuesta: existen dos tipos de respuesta adaptativa:
 - **Inmunidad humoral:** lo constituyen los anticuerpos producidos por los **linfocitos B**. Entre sus funciones principales destaca la neutralización de los microbios, la fagocitosis y la activación del complemento.

- Inmunidad celular: los **linfocitos T** son los responsables de esta respuesta. Se distinguen diferentes clases según la expresión de determinadas proteínas CD en su superficie.

1.3.2. COMPONENTES CELULARES Y MOLECULARES DEL SISTEMA INMUNITARIO

Las diferentes respuestas inmunológicas, innata y adaptativa, son llevadas a cabo por distintos componentes celulares y moleculares con funciones específicas(53),(54).

1.3.2.1. COMPONENTES DE LA INMUNIDAD INNATA

Las principales células de la inmunidad innata son las siguientes:

GRANULOCITOS

Su principal función es la destrucción de los microbios o moléculas extrañas y de los tejidos dañados por éstos. Son las células protagonistas de la inmunidad innata. En este proceso también interactúan con células del sistema inmune regulando su respuesta(55). Dentro de ellos encontramos:

Neutrófilos. Son leucocitos polimorfonucleares que median las primeras fases de las reacciones inflamatorias actuando de forma rápida tras la entrada de sustancias extrañas. Son la población más abundante de los leucocitos circulantes. Contienen gránulos en su interior con enzimas como la lisozima, colagenasa y elastasa. Son esenciales en la defensa contra microorganismos, siendo los primeros en acudir a la zona inflamada. Una vez en el tejido, producen agentes que atraen y regulan la acción de macrófagos, linfocitos T y otros neutrófilos.

Fagocitos mononucleares: se distinguen **monocitos** (células circulantes) y **macrófagos** (células residentes en tejidos). Ejercen su función tanto en la respuesta innata como en la adaptativa. Defienden al organismo mediante la ingestión y lisis de los microbios y otras células muertas por lo que favorecen la limpieza tras la infección y lesión tisular. Son células CD3-CD14+. Los monocitos pueden ser:

- **Clásicos:** suponen el 90% de monocitos, realizan fagocitosis y participan en la respuesta inmune.
- **Intermedios:** monocitos proinflamatorios, reclutados en la fase tardía del proceso inflamatorio, asociados a la presentación antigénica, alta secreción de citoquinas proinflamatorias y a la cicatrización de heridas.
- **No clásicos:** monocitos que cumplen una función de vigilancia local innata y realizan fibrosis.

Los macrófagos activados secretan citoquinas que reclutan otras células y además sirven de células presentadoras de antígenos a los linfocitos T activándolos.

MASTOCITOS: están presentes en la piel y en la mucosa. Contienen gránulos en su citoplasma llenos de histamina y otros mediadores. En su membrana celular expresan receptores de alta afinidad para el anticuerpo IgE, principal anticuerpo de la alergia por lo que son responsables de la sintomatología de las enfermedades alérgicas IgE mediadas.

BASÓFILOS: son similares en función y estructura a los mastocitos, pero éstos circulan en la sangre constituyendo menos del 1% de los leucocitos sanguíneos. Al igual que los mastocitos contienen gránulos con mediadores inflamatorios y expresan receptores para la IgE. Participan en las respuestas alérgicas y anti-helmínticas. Se caracterizan por la expresión de un receptor de alta afinidad a la IgE.

EOSINÓFILOS: Están presentes en la sangre y en tejidos celulares recubriendo la mucosa respiratoria, digestiva y genitourinaria pudiendo aumentar su número en el contexto de una inflamación. Contienen también gránulos con enzimas lesivas frente a paredes celulares de parásitos, pero también de tejidos del propio organismo. Su maduración a partir de precursores mielocíticos de la médula ósea está mediado por citoquinas como GM-CSF, IL-3 e IL-5. Cumplen una función crucial en los procesos inflamatorios y alérgicos, asociados a respuestas Th2.

Otras células de la población mieloide son:

CÉLULAS NK: Son células CD3-CD16+, protagonistas de la respuesta innata, realizan su función citotóxica a través de la secreción de citoquinas y quimioquinas. Poseen receptores inhibidores específicos de MHC de clase I que les permiten diferenciar células normales de otras infectadas o tumorales(56),(57),(58).

- **NK 56++:** productoras de citoquinas proinflamatorias.
- **NK 56+:** fenotipo predominante en sangre periférica, llevan a cabo actividad citolítica gracias a gránulos que contienen perforina y granzimas.
- **NK 56-:** relacionadas con infecciones virales crónicas, tienen una capacidad citolítica menor que las NK 56+.

En la actualidad se desconoce la implicación clínica que tienen los distintos tipos de células NK.

CÉLULAS DENDRÍTICAS (DC): Son las células presentadoras de antígenos más especializadas. Se consideran un importante punto de conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa. Son las encargadas de atrapar a los antígenos que penetran desde el medio externo, llevarlos a los órganos linfáticos y allí presentárselos a los linfocitos T cooperadores CD4 vírgenes o naïve para desencadenar la respuesta inmunológica. Están presentes en la piel, mucosas y parénquima de tejidos.

Dentro de las células dendríticas se distinguen: células mieloides y plasmocitoides:

Mieloides (mDC): conocidas como las DC clásicas, caracterizadas por la expresión de la integrina CD11c.

- **mDC1:** son más eficientes en la presentación antigénica y estimulación de linfocitos T CD4+ que de T CD8+. Poseen propiedades pro-inflamatorias como la secreción de IL-8, IL-23 y TNF- α .

- **mDC2:** expresan TLR-3 y TLR-8 lo que les permite identificar ácidos nucleicos extraños y realizar presentación cruzada de antígenos a las células T CD8+. Secretan IL-12 induciendo la polarización hacia Th1 y favorece la generación de linfocitos T citotóxicos.
- **mDC16+:** son células dendríticas derivadas de monocitos. Desempeñan papeles cruciales en la fase efectora de los linfocitos T CD4+.

Plasmacitoides: son una subpoblación minoritaria que expresan bajos niveles de MHC de clase II y una amplia gama de moléculas co-estimuladoras. Se caracterizan por expresar TLR-7 y TLR-9 y ser una de las principales fuentes de IFN- γ .

Otras células presentadoras de antígeno (APC) son los macrófagos, linfocitos B y linfocitos T citotóxicos CD8+ dado que también reconocen antígenos.

CITOQUINAS: La principal función del sistema inmune innato es la respuesta inflamatoria con la acumulación de leucocitos y proteínas plasmáticas. Las principales citoquinas proinflamatorias de la inmunidad innata son TNF, IL-1 e IL-6. También existen otras citoquinas implicadas como IL-12, IFN tipo I, IL-10, IL-15, IL-18, IL-23 e IL-27.

1.3.2.2. COMPONENTES DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA

LINFOCITOS

Las principales células de la inmunidad adaptativa son los linfocitos. Expresan receptores antigénicos y se distribuyen de forma clonal y específica. Existen distintos subtipos de linfocitos que se diferencian por su marcador CD y su función específica:

- **Linfocitos T CD4+ cooperadores.** Este subtipo de linfocito T se encarga de la activación de macrófagos (inmunidad celular), la inflamación y la activación de otros linfocitos T y B (inmunidad

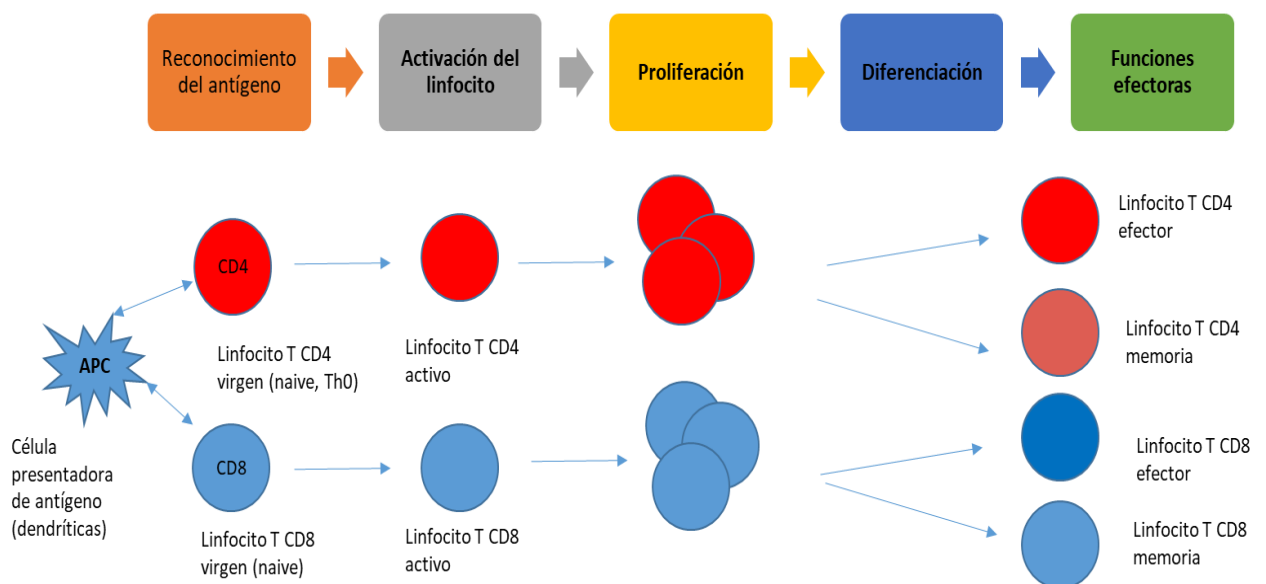
humoral) gracias a la producción de citoquinas tras la presentación del antígeno por las células APC. Se considera a los linfocitos T CD4+ como los coordinadores o “directores” de la respuesta inmunológica. Sus marcadores fenotípicos son: CD3+, CD4+, CD8-.

- **Linfocitos T CD8+citotóxicos.** Se encargan fundamentalmente de destruir células infectadas, cancerosas o defectuosas o de destruir células ajenas (p.e. células de tejidos trasplantados de otro individuo). Sus marcadores fenotípicos son: CD3+, CD4-, CD8+.
- **Linfocitos T reguladores (células Treg):** son una subpoblación de linfocitos T CD4+ con función supresora. Existen dos tipos de Treg: las naturales generadas en el timo, y las inducidas generadas en la periferia en un ambiente rico de citoquinas IL-2, IL-15 y TGF- β a partir de linfocitos T CD4+ convencionales. Se encargan de la supresión de otras respuestas inmunes para limitar o regular respuestas excesivas que podrían tener un efecto perjudicial. Son además las principales responsables de mantener la tolerancia inmune periférica frente a células y tejidos propios. Sus marcadores son: CD3+, CD4+, CD25+, FoxP3+.
- **Linfocitos T NK.** Son células de la inmunidad innata con una función citotóxica, encargadas de destruir células infectadas o tumorales. Sus marcadores son: CD3+, CD56+, CD16+.
- **Linfocitos T $\gamma\delta$:** tienen funciones de cooperación y citotóxicas propias de la inmunidad innata. Sus marcadores son: CD3+, CD4+, CD8 variable.
- **Linfocitos B:** tanto los foliculares como los marginales se encargan de la producción de anticuerpos (inmunidad humoral). Se definen por la expresión de CD19+ y CD20+.

Según las fases de la respuesta inmunológica tras el contacto con el agente extraño, los linfocitos T (CD4 y CD8) se clasifican en vírgenes, activados, efectores y memoria(59). En primer lugar, los linfocitos se producen en la médula

ósea, maduran en los órganos linfáticos (los B en la médula ósea y los T en el timo), denominándose en este punto **linfocitos vírgenes**, y después circulan por la sangre a los órganos linfáticos secundarios (ganglios linfáticos, bazo, mucosas). En éstos órganos linfáticos se pueden activar por antígenos desencadenando su activación y proliferación (expansión clonal) y diferenciación a **células efectoras** y de **memoria** que migrarán a los tejidos (Figura 4). Los linfocitos T CD4 efectoras son los que activan a macrófagos, linfocitos B y otras células produciendo inflamación. Los linfocitos T CD8 efectoras son los que inducen la muerte de células infectadas y activan a macrófagos.

FIGURA 4: Tipos de linfocitos T según las fases de la respuesta inmunológica.

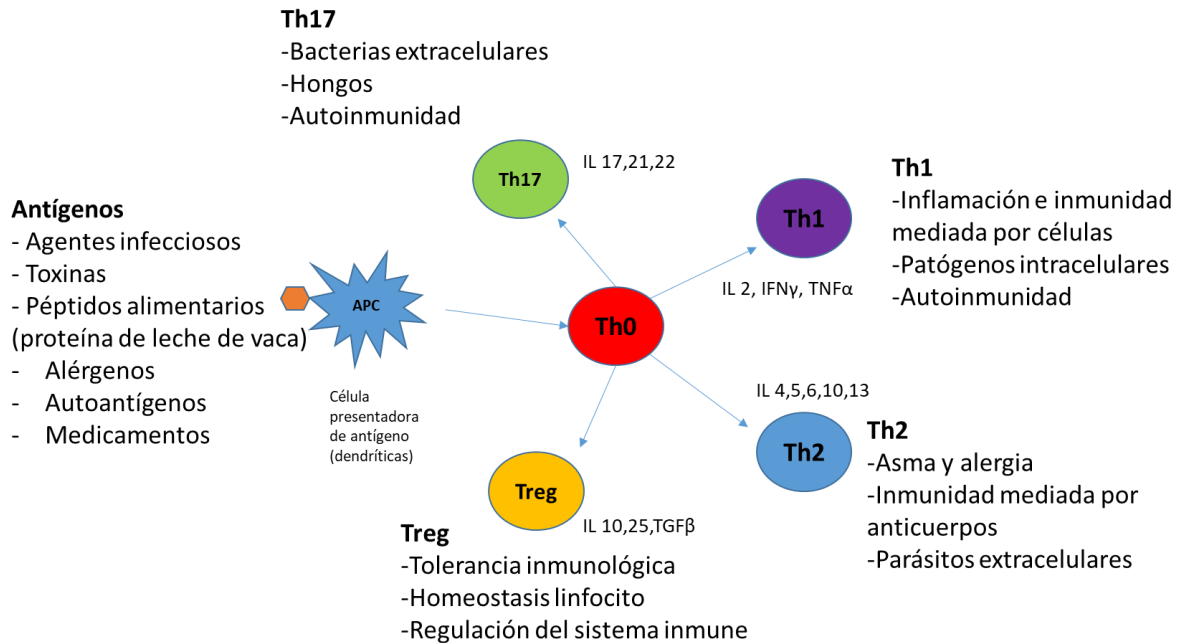


LINFOCITOS T CD4 EFECTORES

Se generan tras el reconocimiento del antígeno en los órganos linfáticos secundarios. Dentro de este grupo de linfocitos se distinguen distintos subgrupos: Th1, Th2 y Th17. Los linfocitos T reguladores (Treg) son otra población de linfocitos T CD4+ pero no son efectoras, sino supresores de la reacción inmune frente a lo propio y reguladores de la respuesta inmunológica(60),(61).

En el siguiente esquema se resume las funciones y las citoquinas de los distintos subtipos de células T CD4.

FIGURA 5: Esquema de respuesta inmunológica mediada por células T CD4+ en el que se resumen los subgrupos celulares, citoquinas que median su diferenciación (flecha) y sus funciones.



- **Linfocito Th0:** son células TCD4 precursoras que todavía no han definido un fenotipo Th1, Th2 o Th17.
- **Linfocito Th1:** Es clave en la defensa frente a infecciones, produce la activación del macrófago para defenderse fundamentalmente de los microbios intracelulares (virus y bacterias) y parásitos. Esta respuesta Th1 es responsable también de enfermedades autoinmunes y del daño tisular asociado a infecciones crónicas. Su principal citocina efectora es el IFN γ pero también están otras como TNF, perforina, etc.
- **Linfocito Th2:** Se encarga de activar a eosinófilos y mastocitos e induce la producción de IgE responsable de las **enfermedades**

alérgicas. Además, está implicado en la inmunidad frente a bacterias extracelulares. Su principal citocina efectora es la IL4, pero también están otras como la IL5, IL6 e IL13.

- **Linfocito Th17:** se encarga de la inflamación con activación de neutrófilos y monocitos para la defensa contra bacterias extracelulares, hongos y parásitos. Esta respuesta es responsable de enfermedades inflamatorias autoinmunes y se ha asociado con enfermedades como la psoriasis. Sus principales citoquinas son la IL 17 e IL 22(62).
- **Subpoblación Th1-17:** células de función desconocida con un fenotipo mixto productoras simultáneamente de IL-17 y citoquinas de tipo Th1.

LINFOCITOS B

Son células CD3-CD19+ y son las protagonistas de la inmunidad humoral(63).

Se distinguen distintos fenotipos de maduración:

- **Naïve:** células B que aún no han sido expuestas a antígeno.
- **Mem non-switch:** células B memoria que no han cambiado de isotipo, es decir, que no han sido activadas, con capacidad de recircular por los órganos linfoides. En superficie siguen presentando IgM e IgD.
- **Mem switch:** células B memoria que han realizado cambio de isotipo con capacidad de recircular por los órganos linfoides. Expresan en superficie IgG e IgA.
- **Mem CD27-:** células B memoria que han perdido la expresión de CD27 y que realizan la hipermutación somática a bajos niveles en comparación con las Mem switch.

- **Plasmablastos:** células B que se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos.

Dentro de los linfocitos B también existen subpoblaciones reguladoras(64),(65):

- **Linfocitos B reguladores I (Breg I):** producen IL-10 y suprimen a las células T CD4+ efectoras, monocitos y células dendríticas.
- **Linfocitos B reguladores II (Breg II):** encontradas en zonas de inflamación, productoras de IL-10. Inducen a las Treg y suprimen a las células Th1 y Th17, y las respuestas T CD8+.

1.3.3. INFLUENCIA DE LA EDAD EN EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

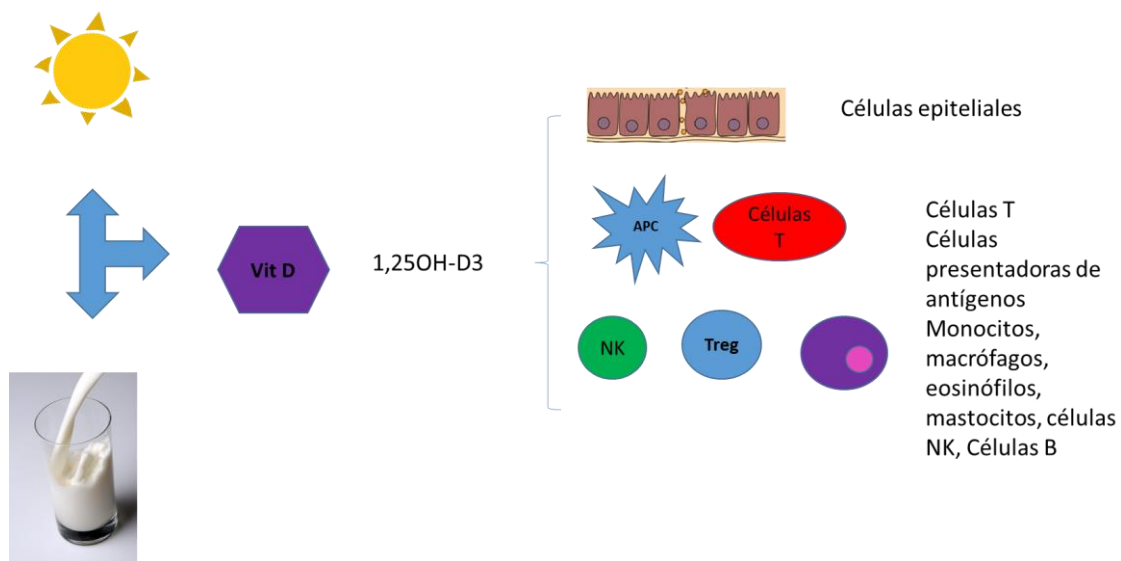
En la actualidad, numerosos estudios han demostrado que existen diferencias marcadas entre las respuestas inmunes de niños y adultos. Estas se deben por un lado a la inmadurez del sistema inmune durante los primeros años de vida que puede comprometer la eficacia o la funcionalidad del sistema inmune (66), pero además se ha demostrado que la función tímica preservada en niños proporciona una mayor capacidad de reconstitución o adaptación a las agresiones a las que se enfrenta dicho sistema inmune. La inmadurez de estas células podría contribuir a la alta incidencia de alergias alimentarias que se dan en las primeras etapas de vida y que en muchos casos se resuelven de forma espontánea o con la ayuda de protocolos de desensibilización oral. De hecho un estudio reciente demuestra que niños que presentaban alergia al huevo muestran evidencias de tener una función reguladora o Treg reducida asociada a un aumento de respuestas de tipo Th2, que se normalizan tras la desensibilización oral o SOTI(67).

1.3.4. LA VITAMINA D Y EL SISTEMA INMUNE

La vitamina D y su metabolito activo 1,25 (OH) vitamina D tiene un papel en el sistema inmune actuando como inmunomodulador y mejorando los mecanismos de defensa de la inmunidad innata y adaptativa. Numerosas células inmunes expresan el receptor de vitamina D (VDR). Estudios previos muestran una implicación de la vitamina D como hormona inmunorreguladora a través de la expresión de la ILT3 en las células dendríticas(68). Esta vitamina ejerce su acción

en las células presentadoras de antígenos (APC) pero también puede influir en las células T inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias y promoviendo un perfil estable de las células Treg(69). Otros estudios muestran una asociación entre valores bajos de vitamina D y el desarrollo de enfermedades alérgicas dado que esta hormona ejerce un papel inmunorregulador en distintas poblaciones inmunológicas(70),(71),(72) (ver figura 1.2.1.4.). Los valores de 25(OH)vitamina D son un buen indicador del nivel de ingesta de este nutriente. Sin embargo, se desconocen los valores de normalidad en niños menores de un año y sigue habiendo controversia entre el punto de corte para considerar unos valores insuficientes o deficientes. Actualmente en adultos los valores de suficiencia están por encima de 30µg/L(48).

FIGURA 6: Interacciones de la Vitamina D en las diferentes poblaciones inmunológicas.



1.4. RESPUESTAS INMUNES IMPLICADAS EN LA ALERGIA ALIMENTARIA Y TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

1.4.1. ALERGIA ALIMENTARIA IgE-MEDIADA

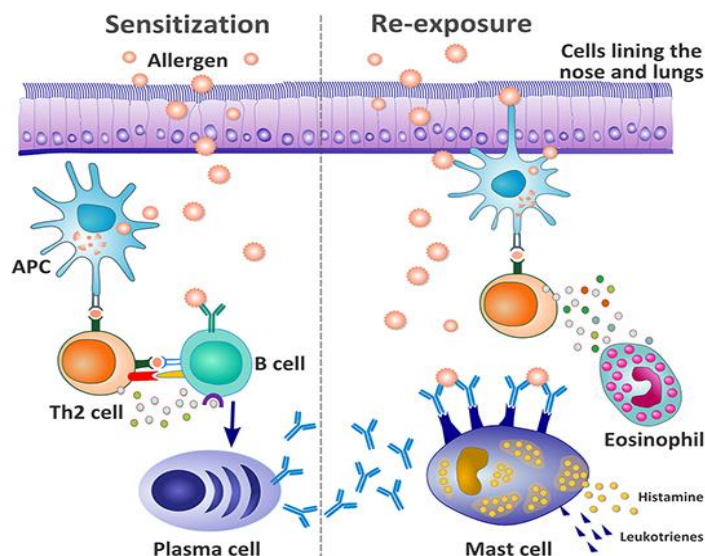
En las enfermedades alérgicas se producen reacciones frente a unos antígenos no microbianos pero reconocidos como extraños, denominados **alérgenos**(73).

Estos alérgenos estimulan la **respuesta Th2** de linfocitos T cooperadores productores de IL-4, IL-5 e IL-13, además de la síntesis de IgE por los linfocitos B(74). La IgE sensibiliza a los mastocitos (**sensibilización alérgica**), y la exposición posterior al alérgeno los activa para que secreten los mediadores responsables de las reacciones de **hipersensibilidad inmediata**, como la histamina que provoca la vasodilatación y contracción músculo liso bronquial. Esta respuesta comienza rápidamente en pocos minutos tras la exposición al alérgeno. Posteriormente hay una reacción de fase tardía (a las 2-4 horas) en la que se acumularán neutrófilos, eosinófilos (reclutados por IL-4 y activados por la IL-5), basófilos (por la IL-3) y otros linfocitos TCD4+ produciendo el componente inflamatorio de fase tardía o retardada de la reacción alérgica(75). Las reacciones tardías pueden aparecer sin un precedente detectable de hipersensibilidad inmediata como ocurre en el caso del asma bronquial.

Las reacciones alérgicas se manifiestan en diferentes formas y en distintos órganos pudiendo producir exantemas y habones (urticaria), congestión sinusal (rinitis), constricción bronquial (asma extrínseca), dolor abdominal y diarrea (síntomas digestivos) o shock sistémico (anafilaxia) siendo ésta la forma más grave. En concreto en las **alergias alimentarias**, los alérgenos derivan de los alimentos que se ingieren y activan a mastocitos de la mucosa intestinal y orofaríngea, desencadenando la cascada inflamatoria asociada a la alergia.

Los alérgenos, a diferencia de los microbios, se exponen de forma repetida y no estimulan respuestas inmunitarias innatas que inducen la secreción de citoquinas por el macrófago y células dendríticas productoras de la respuesta Th1 y Th17. Por ello la activación crónica y repetida de los linfocitos T CD4 pone en marcha de forma predominante la vía Th2(76).

FIGURA 7: Resumen de la secuencia de reacciones de hipersensibilidad inmediata propia de las alergias IgE mediadas.



Fuente: *National Institute of Allergy and Infectious Disease, USA.*

1.4.2. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

Se define como la falta de respuesta a un antígeno tras la exposición anterior a éste. En las respuestas inmunitarias, tras la exposición de un linfocito a un antígeno, éste puede activarse y originar respuestas inmunitarias o por el contrario inactivarse y eliminarse. Este último caso condiciona la **tolerancia inmunológica**. En un sistema inmunitario normal existe una tolerancia frente a los antígenos propios, pero si existe una alteración inmunológica en este punto puede desencadenar reacciones de autoinmunidad y **enfermedades autoinmunes**.

La principal célula responsable de la tolerancia inmunológica es el **linfocito T regulador (Treg)**(77). Los linfocitos inmaduros tras reconocer a los antígenos propios en el timo pueden morir, inactivarse, cambiar su especificidad (linfocitos B) o evolucionar a linfocitos Treg responsable de la tolerancia a nivel periférico(78). Estos linfocitos Treg suprimen activamente a los linfocitos específicos frente a antígenos propios a través de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 o TGF- β (79). Para el desarrollo y supervivencia del linfocito Treg se precisa la IL-2 y el factor de transcripción FoxP3(80),(81). Por ello el marcador FoxP3 es actualmente el marcador definitivo que permite identificar a las células T reguladoras(82). Estas células Treg se encargan también de la inhibición de las

funciones efectoras del linfocito T(83), y también son capaces de suprimir la respuesta de otras células inmunes (B, NK, granulocitos, monocitos, etc).

La inducción a la tolerancia inmunológica, inmunoterapia o SOTI, se ha empleado como método terapéutico para evitar respuestas inmunitarias de enfermedades autoinmunes y alérgicas(84)(85)(86). La inmunoterapia ha demostrado que se asocia con la inducción de la tolerancia periférica en las células T mediante la generación de Treg que secretan las citoquinas supresoras IL-10 y TGF- β (88). Se desconoce cómo se generan estas células Treg.

Como se ha comentado previamente, los basófilos producen citoquinas como la interleuquina-4 (IL-4), e IL-13, que son fundamentales para las manifestaciones de las enfermedades alérgicas y han mostrado participar en la tolerancia a los alérgenos alimentarios(87). Las citoquinas inflamatorias producidas por las células efectoras T CD4 son esenciales en la expansión y la activación de basófilos y mastocitos.

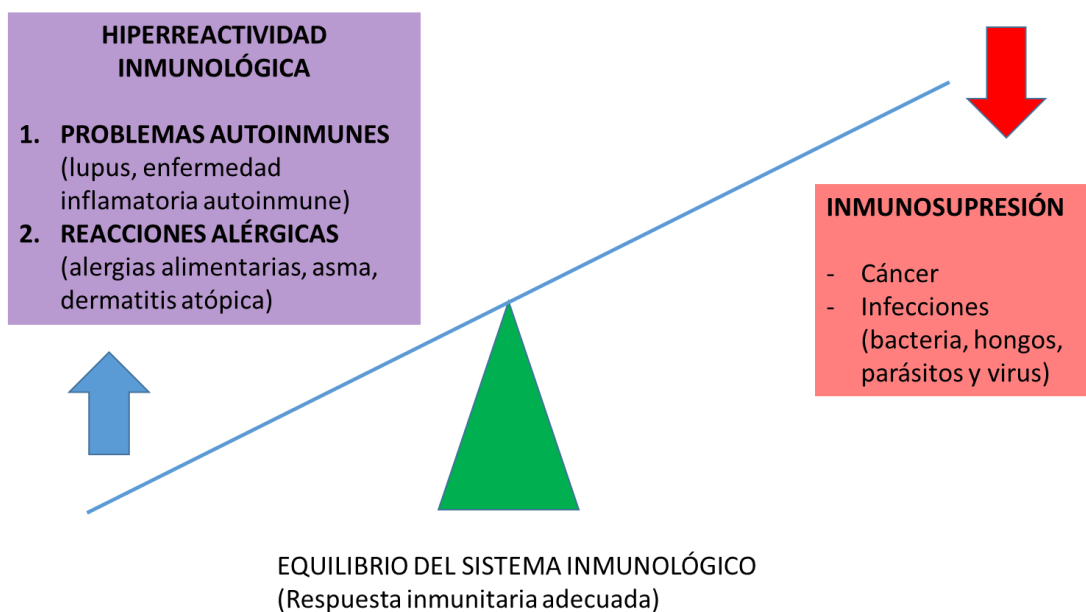
En otro estudio(89), se ha visto una marcada reducción en los niveles plasmáticos de diferentes citoquinas Th1 y Th2 tras la consecución de tolerancia: descende la concentración de IL-2, TNF α y IFN γ (citoquinas de la respuesta Th1) y descende la IL-5, IL-10 (de la respuesta Th2); la IL-9 de la Th9, la IL-22 (Th22) y la IL 17-A (Th17). Durante la tolerancia, no se ha observado alteración en los porcentajes ni en el número de monocitos, basófilos, neutrófilos ni eosinófilos. En niños alérgicos sí se encontró una correlación directa entre el %TEM y número de basófilos, pero sin cambios tras el SOTI. Otros artículos han demostrado que los basófilos disminuyen a medida que se normalizan los síntomas.(87)

1.4.3. REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

El buen funcionamiento del sistema inmune se debe a la estricta regulación del mismo. Esta función la ejerce fundamentalmente las células T reguladoras (Treg), subtipo celular T CD4+(43). Las células T reguladoras son células T CD4+ con función supresora definidas por los siguientes marcadores: CD3+CD4+CD25+CD127^{low}/-Foxp3+.

Un desequilibrio en el sistema inmunológico puede provocar patología tanto por la hiperreactividad del sistema inmunológico (enfermedades autoinmunes, reacciones alérgicas) como por la inmunosupresión (cáncer o infecciones) (Figura 7).

FIGURA 8: Esquema de las patologías producidas por una alteración en el equilibrio del sistema inmunológico.



1.4.3.1. CÉLULAS T-REG EN PREMATUROS

En el estudio de Correa et al(66), se indica que las Treg tienen un papel importante en la tolerancia materno-fetal. Los recuentos absolutos de la mayoría de células inmunológicas incluidas monocitos, granulocitos, células B, células NK, células CD4 + y T CD8 +, fueron notablemente menores en los recién nacidos prematuros a diferencia de los nacidos a término. Sin embargo, al contrario que estas células, las células Treg eran el único subconjunto celular que no disminuían encontrándose en una frecuencia mayor que en recién nacidos a término lo que podría explicar la leucopenia de la prematuridad(90),(66).

1.4.3.2. ESTUDIOS PREVIOS CON CÉLULAS T-REGULADORAS (T-reg) EN ALERGIA.

Las células Treg juegan un papel clave en diversas patologías relacionadas con el sistema inmune(91). En los últimos años se han publicado numerosos

trabajos que muestran en modelos animales el papel clave que juegan las células Treg en los procesos alérgicos, incluyendo alergias alimentarias(92). También se ha demostrado la eficacia de terapias encaminadas a aumentar la presencia de células Treg resolviendo procesos alérgicos, llegando incluso a suprimir por completo la alergia. En humanos también se ha determinado que las Treg juegan un papel clave en alergia al polen, asma o alimentos(93). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado en adultos y existen pocos datos sobre el papel de estas células en niños y en los procesos alérgicos que tienen una alta incidencia en la infancia sobre todo en cuanto a alergias alimentarias.

Las células Treg representan un tipo de células CD4 responsables de limitar el daño durante la respuesta inmune participando en el control de las cel T efectoras (TEM) implicadas en el mecanismo alérgico.

1.4.3.3. LAS CÉLULAS T-REG EN LA ALERGIA INFANTIL

Algunos estudios, tanto en modelos animales como humanos, demuestran que las enfermedades alérgicas se deben a una respuesta inmune aberrante mediadas a través de células T-helper de tipo 2 (Th2), y las células Treg han demostrado ser cruciales en el control de la respuesta alérgica al suprimir las células T-efectoras específicas de alérgeno.

Los niños alérgicos (con reacciones mediadas por IgE) presentan mayor número de células T memoria (TEM=effector-memory CD4+ T cells) en comparación con los niños no alérgicos(91),(89). La respuesta inmune a los alérgenos en la salud y la enfermedad es el resultado de un equilibrio entre las células Treg y células T efectoras (TEM), y un cambio en el subconjunto dominante puede conducir al desarrollo de alergia (aumento de TEM) o el logro de tolerancia (aumento de Treg)(94).

1.4.3.4. LAS CÉLULAS T-REG EN LA INDUCCIÓN A LA TOLERANCIA ORAL

La inducción a la tolerancia oral (SOTI) o desensibilización con alimentos consiste en la administración oral progresiva de pequeñas cantidades crecientes del alimento alergénico, bajo control médico, hasta alcanzar la tolerancia inmunológica de una cantidad determinada según el caso clínico(85),(95). A partir de este momento el paciente puede introducir esa cantidad de alimento alergénico

en su dieta habitual con lo que se consigue, fundamentalmente, una mejora en la calidad de vida del mismo.

Las células Treg han demostrado en modelos animales un papel crucial en la tolerancia oral a los antígenos alimentarios(96). Algunos estudios(91) han evaluado si las Treg están implicadas en la desensibilización mediada por SOTI a los alérgenos alimentarios en los seres humanos. En el estudio de Fuentes(91) , muestra como la desensibilización tras SOTI normaliza los niveles de las células Treg por lo que podría ser un marcador de adquisición de tolerancia.

Este estudio demuestra como la SOTI induce un aumento en la frecuencia y el número de las células Treg que se asoció con una disminución de células TEM (T-CD4), por lo que se produjo un aumento de la ratio Treg/TEM. Dentro de este fenotipo Treg, no se observa cambios significativos en la proporción de Treg-naïve (definida como CD4+CD25+Foxp3+CD45RA+) o efector-Treg (TEM), definida como CD4+CD25+Foxp3+CD45RAneg) después de SOTI.

1.4.4. FISIOPATOLOGÍA DE LAS ALERGIAS NO-IgE MEDIADAS (PROCTOCOLITIS ALÉRGICA)

La fisiopatología de la proctocolitis alérgica se desconoce en el momento actual, aunque se sabe que no se debe a un mecanismo IgE típico de las reacciones alérgicas inmediatas(97).

Se cree que existe un paso de antígeno a través de la mucosa intestinal que induce la sensibilización y la liberación de mediadores inflamatorios. Algunos autores destacan la importancia del eosinófilo en la patogenia de la proctocolitis dado que en las biopsias intestinales se encuentran infiltrados de eosinófilos bajo las erosiones del epitelio cerca de los nódulos linfoides y los receptores IgA(98).

En general, los mecanismos inmunopatogénicos de las reacciones no-IgE mediadas permanecen aún desconocidos aunque se cree que las células T están implicadas(10). Estudios previos en enterocolitis alérgica (FPIES) han demostrado que en estos pacientes existe una proliferación linfocítica en comparación con controles sanos por lo que se considera a las reacciones no IgE mediadas como

reacciones alérgicas en vez de intolerancias sin base inmunológica. Otros estudios(99) sugieren que el TNF- α secretado por las células T produce una alteración de la permeabilidad intestinal favoreciendo el paso de los antígenos a través de la submucosa y estimulando la activación linfocítica. Esto explicaría el hallazgo de niveles elevados de TNF- α en las heces de pacientes con enterocolitis alérgica. Sin embargo, estos hallazgos y sus implicaciones clínicas se desconocen en la actualidad.

Recientemente se ha postulado un posible mecanismo autoinmune en la proctocolitis alérgica a raíz del estudio de Skerkova *et al* en el que se encontraron una elevación de los anticuerpos IgG atípicos p-ANCA en 24 de 25 pacientes con proctocolitis comparada con ninguno de los 18 controles estudiados (100).

1.4.4.1. CÉLULAS T-REGULADORAS EN PROCTOCOLITIS ALÉRGICA

El único estudio publicado hasta la fecha sobre células T reguladoras en proctocolitis alérgica es el de Cseh *et al*(101). Se estudiaron 34 lactantes con lactancia materna exclusiva que presentan hematoquecia, no asociado a fallo en el crecimiento. De estos pacientes, solo se realiza estudio inmunológico a 10 pacientes (n=10) en los que persiste la hematoquecia tras la exclusión de las PLV y el huevo en la alimentación materna, y en los que se confirma con colonoscopia el infiltrado eosinofílico característico. A éstos pacientes se les excluye la lactancia materna y se administra una fórmula elemental, repitiéndose el estudio inmunológico tras resolución del cuadro clínico (una media de 2 meses). Se comparan con 10 controles de lactantes sanos. Se observa una disfunción inmunológica en los pacientes con colitis alérgica persistente con disminución del número de células T-reguladoras ($p=0.03$), un aumento de la ratio naïve/memoria en la población de células T ($p=0.02$), disminución de células T activadas CD4+CD25+ ($p=0.01$) y predominio de linfocitos Th2 sobre Th1. Los autores postulan que esta inmadurez inmunológica pueda ser secundaria a la falta de exposición a antígenos (Teoría de la higiene) por lo que podría explicar un posible efecto beneficioso el tratamiento con algunas cepas probióticas para favorecer la madurez del mismo. El principal sesgo de este estudio radica en la metodología de la cuantificación de células inmunes dado que se realiza sobre células

congeladas y sólo aporta valores de porcentaje sin tener en cuenta los valores absolutos.



CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La etiopatogenia inmunológica de las alergias a proteínas de leche de vaca no mediada por IgE, y por tanto también de la proctocolitis alérgica, es desconocida. Por ello se carece de marcadores diagnósticos que permitan identificar estos procesos alérgicos no IgE mediados y poder diferenciarlos, por ejemplo, de trastornos funcionales digestivos en el caso de los síntomas menores o atípicos. La gran prevalencia de estas entidades en el momento actual (0,5-2%) así como un incremento de su incidencia en los últimos años explican la relevancia de este estudio. La presunción de un mecanismo alérgico no IgE mediado en un paciente con un trastorno funcional digestivo conlleva un aumento del gasto sanitario en la sociedad y los padres (derivado del consumo de fórmulas hidrolizadas de proteínas de leche de vaca) y repercusiones en el estado nutricional del paciente.

Se pretende con este estudio, no sólo entender la fisiopatología inmunológica que subyace a estas entidades, sino si fuera posible, encontrar un marcador específico para el diagnóstico de la alergia a proteínas de leche de vaca no mediada por IgE que se manifieste como proctocolitis alérgica. Además de comprender mejor la etiopatogenia inmunológica de esta entidad clínica, este proyecto podría suponer un gran avance en el diagnóstico, así como en el tratamiento adecuado para este tipo de patologías no IgE mediadas.

Como ya se ha mencionado con anterioridad existen pocos estudios publicados en este campo y no se han extrapolado a la práctica clínica habitual, por lo que este proyecto aportaría grandes avances tanto en el campo de la investigación científica como en su aplicación a la práctica diaria.



CAPÍTULO 3: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS-PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Tras la revisión bibliográfica y el estudio de la situación actual del problema se plantea la siguiente hipótesis de estudio:

“Las células T reguladoras (Treg) juegan un papel clave en la fisiopatología por la cual se desencadena la clínica de proctocolitis alérgica en niños”.

3.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

3.2.1. OBJETIVO PRINCIPAL.

El objetivo de este proyecto es investigar si existe alguna desregulación inmune, con especial interés en la población Treg, que esté implicada en el desarrollo de la alergia a proteínas de leche de vaca no mediada por IgE, en concreto en la proctocolitis alérgica.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos son:

1º- Analizar mediante citometría de flujo la población de Treg y otras subpoblaciones celulares en una cohorte de niños diagnosticados de proctocolitis alérgica y establecer la correlación entre los valores de Treg, poblaciones inmunitarias y el proceso alérgico.

2º.- Determinar mediante citometría de flujo el perfil inmunológico en población sana midiendo las distintas subpoblaciones celulares, incluidas las Treg, en un grupo control de niños sanos de edades similares a los casos de proctocolitis.

3º- Estudiar la existencia de alteraciones inmunes relacionadas con el desarrollo de la enfermedad (proctocolitis alérgica), e identificar marcadores inmunológicos de interés diagnóstico.

3.2.3. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1.- Determinar el carácter pronóstico o predictivo de los valores de Treg o de otros marcadores inmunes en estas patologías. Para ello se compararán los valores

para las distintas poblaciones inmunes, incluido los valores de Treg, en dos tiempos:

T0: al diagnóstico de proctocolitis alérgica, previo a la dieta de exclusión

Tresolución: al resolverse la sintomatología clínica por completo (tras un tiempo mínimo de los 2 meses desde la dieta de exclusión).

2.- Comparar la evolución clínica de los pacientes en otros tiempos de estudio en función del estado inmunológico y en función del tratamiento recibido:

T1: antes de la introducción y valoración de tolerancia a proteínas de leche de vaca (a partir de los 9-10 meses según el caso).

T2: se define al tiempo en el que se considera resuelta la adquisición de tolerancia oral a PLV.

3.- Comparación de valores de células Treg tras tratamiento con dieta de exclusión según el tratamiento:

1. Niños con tratamiento con hidrolizado extenso de proteínas de leche de vaca (HePLV) con o sin lactancia materna.
2. Niños con tratamiento con HePLV y probioticoterapia (Lactobacillus GG).
3. Niños con tratamiento con hidrolizado de arroz.
4. Niños con lactancia materna con dieta materna de exclusión de PLV en la dieta materna (en aquellos con lactancia materna exclusiva).

4.- Analizar las **poblaciones linfocitarias** y **células productoras de citoquinas** en los distintos tiempos del estudio para entender mecanismo fisiopatológico.

5.- Analizar los valores de Vitamina D en la proctocolitis en fase aguda ya que parece estar implicada en la supervivencia de las células T reguladoras y compararla con los valores de vitamina D en población sana.

6.- Determinar un posible marcador inmunológico (población celular, interleuquinas o citoquinas) que sirva como prueba diagnóstica con buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de proctocolitis alérgica y otras

patologías no IgE mediadas. Este objetivo es de gran relevancia clínica dado que, como ya se ha explicado anteriormente, estas reacciones (enteropatía, enterocolitis y síntomas menores) pueden resultar difíciles de confirmar en la práctica clínica por la negatividad de las pruebas.



CAPÍTULO 4: POBLACIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Para alcanzar los objetivos mencionados se diseñó un estudio observacional, analítico, prospectivo y comparativo entre dos grupos de similar edad (grupo proctocolitis y grupo de controles sanos).

El estudio se realizó en la Sección de Digestivo Infantil del Hospital Gregorio Marañón, hospital terciario de Madrid con una actividad asistencial de alrededor de 1150 consultas nuevas al año.

Para el seguimiento y tratamiento de los pacientes diagnosticados de proctocolitis alérgica se siguió el protocolo clínico de acuerdo con las guías de práctica clínica establecido en la Sección de Digestivo Infantil. El diagnóstico clínico de los pacientes se realiza en la primera consulta con el paciente basándose en los criterios clínicos publicados en las guías de práctica clínica mencionadas. Como parte del diagnóstico, se toma una muestra de sangre para analizar la IgE específica a leche de vaca (InmunoCAP) y descartar así una alergia mediada por IgE. Posteriormente se instaura el tratamiento con exclusión de proteínas de leche de vaca y soja de la dieta del paciente y se ofrece alimentación con fórmula hidrolizada de proteínas de leche de vaca durante un mínimo de 6 meses. En aquellos pacientes alimentados de forma exclusiva con lactancia materna, el tratamiento consiste en la exclusión de las proteínas de leche de vaca en la alimentación de la madre. En una segunda visita, dentro de las siguientes cuatro-seis semanas desde la primera, además de revisar e informar de los resultados analíticos antes descrito, se comprueba la respuesta clínica del paciente. Si ha sido adecuada, se citará de nuevo para control clínico en un periodo entre 3-4 meses. Alrededor de los 6 meses desde la instauración del tratamiento, y en función de la situación clínica del paciente, se inicia la reintroducción de proteínas de leche de vaca completas de manera progresiva según las recomendaciones de las guías de práctica clínica.

Se pretende investigar si esta tolerancia posterior de las proteínas completas se debe a un incremento en porcentaje o número absoluto de células Treg en circulación o a una mejora en la función de estas células. Para ello, se obtuvo una muestra de sangre periférica previamente al inicio del tratamiento con

fórmula hidrolizada (T0) o tras la resolución de la sintomatología tras la instauración del tratamiento (Tres).

La extracción de sangre en el paciente para el estudio solo está justificada en el caso de que el paciente precise un control analítico para el diagnóstico de proctocolitis aguda. En estos pacientes, solo se realiza una única analítica para el análisis de la IgE específica a PLV o InmunoCAP y descartar una alergia mediada por IgE. Por tanto y dado que sólo está justificado una única extracción analítica se analizarán un grupo de pacientes en T0 y otro grupo diferente de pacientes en T resolución. La inclusión del paciente en el estudio no supone ninguna extracción analítica extraordinaria.

Dado que en la reintroducción de las PLV en la dieta no se necesita nuevo control analítico si ya se dispone de InmunoCAP previo negativo, no se ha encontrado justificado, desde el punto de vista ético, extraer muestras de sangre en los demás tiempos del estudio (reintroducción de proteínas completas en la dieta o T1 y adquisición de tolerancia a las proteínas de leche de vaca o T2). En estos tiempos únicamente se registró la evolución clínica y antropométrica del paciente.

Las muestras para los estudios inmunológicos se procesaron en el Laboratorio de Inmuno-regulación (dirigido por el Dr. Rafael Correa Rocha) del Hospital Gregorio Marañón de Madrid y con la ayuda de su personal técnico. Este equipo se responsabilizó de los análisis experimentales, así como del correcto almacenamiento de las muestras de plasma.

El análisis estadístico y bioinformático se realizó en la Unidad de Metodología y Bioestadística de la Fundación para la Investigación del Hospital Universitario Gregorio Marañón de Madrid.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Gregorio Marañón (CEIC 61/12) que se adjunta en los anexos.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El proyecto se llevó a cabo en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) gracias a la colaboración del Laboratorio de Inmunoregulación y la Sección de Digestivo Infantil del Hospital Materno Infantil.

Reclutamiento de pacientes: El reclutamiento de los pacientes se realizó en las consultas de Gastroenterología Pediátrica. Los pacientes fueron remitidos desde la Sección de Urgencias o desde Atención Primaria iniciándose tratamiento de exclusión de proteínas de leche de vaca tras la sospecha de proctocolitis alérgica.

En todos los casos, se solicitó consentimiento informado a los padres o tutores legales de cada niño incluido en el estudio. Tras la firma del consentimiento informado se extrajo una muestra específica de sangre para el estudio coincidiendo con una extracción analítica como parte de la práctica clínica habitual para el diagnóstico del paciente. En ningún caso se extrajo más sangre de la debida y siempre la cantidad fue acorde con la edad del niño. La extracción de sangre se realizó por venopunción tras la aceptación del consentimiento informado.

Como grupo control se obtuvo sangre de niños sanos que acudieron a la consulta de Pediatría General o Cirugía Pediátrica para la realización de intervenciones menores previa obtención de consentimiento por parte de los padres. Los niños sanos del grupo control no tenían ninguna enfermedad infecciosa ni patología inflamatoria o digestiva intercurrente en el momento de la inclusión.

Manejo de los pacientes: los casos de proctocolitis alérgica diagnosticados en la consulta y enrolados en este estudio se manejaron siguiendo los protocolos establecidos y publicados en las guías de práctica clínica de 2012(25). Al diagnóstico en las consultas, basado en la clínica del paciente, se extrajeron las muestras de sangre necesarias (coincidiendo con el estudio InmunoCAP de proteínas de leche de vaca) y posteriormente se inició el tratamiento de exclusión de PLV en la dieta del niño con fórmulas extensamente hidrolizadas de PLV con o sin probióticos o fórmulas hidrolizadas de arroz a

criterio del médico facultativo. En caso de que la alimentación del paciente fuera con lactancia materna exclusiva se instauró una alimentación materna con exclusión de las PLV en la dieta de la madre. Se realizaron controles posteriores en consulta: a las 2 semanas del inicio de tratamiento y tras la resolución de la sintomatología cada 2-3 meses. Según las guías de práctica clínica, a partir de los 9-10 meses según la sintomatología del paciente se reintrodujeron las PLV en la dieta y se realizó un control clínico posterior para confirmar la tolerancia. En cada control en consultas se registró sintomatología del paciente y datos antropométricos, así como posible transgresiones dietéticas o enfermedades intercurrentes. Tras adquirir la tolerancia clínica a PLV se dio el alta al paciente de las consultas de Digestivo infantil.

Manejo de los datos: Todas las muestras fueron anonimizadas. Los datos para el estudio se obtuvieron de la anamnesis y de la Historia clínica del paciente en el centro.

Los datos de interés para el estudio que figuran en la historia clínica se recogieron de forma disociada (es decir sin datos identificables solo con un código) en el cuaderno de recogida de datos que se custodió en el archivo compartido del servidor del hospital con un acceso restringido y seguro para los miembros del equipo investigador exclusivamente.

Solo el Investigador y su equipo tuvieron acceso a la lista que relaciona los códigos con los datos identificativos de los pacientes. Dicha lista fue custodiada por el Investigador principal y tuvo un acceso limitado.

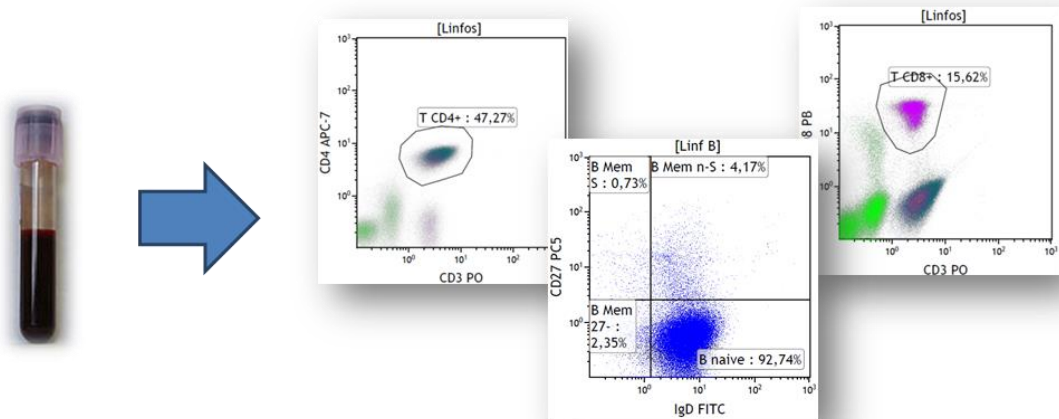
Tamaño muestral: El tamaño muestral estimado por publicaciones previas sobre células T reguladoras en alergia a huevo (89) ,(101) y en proctocolitis alérgica fue de 20 niños diagnosticados de proctocolitis alérgica y 10 niños sanos como grupo control. Se consultó la idoneidad del cálculo del tamaño muestral para encontrar diferencias significativas con la Unidad de Metodología y Bioestadística. Dado que en estudios previos similares se reclutaron una media de 20 casos y 10 controles, se consideró adecuado este tamaño muestral. No se pudo realizar una predeterminación del tamaño muestral basado en la mínima diferencia clínicamente relevante del valor de células T reguladoras en

proctocolitis por dos motivos principales: se desconoce esta mínima diferencia en valores absolutos en niños con proctocolitis dado que sólo existe un estudio previo cuyos resultados se expresan en porcentaje y no en valor absoluto(101). Además, se desconoce el valor de normalidad del número de células T reguladoras en lactantes de edades similares a los pacientes con proctocolitis. Los estudios previos que muestran valores de células T reguladoras en lactantes sanos lo hacen en una población de edad significativamente mayor a la de nuestro estudio(101).

Tras el reclutamiento de pacientes, con un tamaño muestral final de 42 pacientes, se calculó el tamaño de efecto (D de Cohen) o cociente entre la diferencia de medias y su desviación típica. Para este tamaño muestral, habría un 76% de potencia para detectar tamaños de efecto de 1 o superiores considerados grandes y un 27% de potencia para detectar tamaños de efecto medianos.

Manejo de muestras biológicas y material utilizado: A partir de la sangre total del paciente se reservó 300 uL para citometría de flujo en la que se realizó el marcaje con anticuerpos de superficie e intracelulares para determinar el porcentaje y número absoluto de distintas subpoblaciones linfocitarias con el fin de analizar el estado inmunológico general de cada individuo. Con el resto de sangre se extrajeron las células (PBLs) por gradiente de Ficoll para analizar la población de células Treg por citometría (1×10^6 PBLs). Se almacenó el plasma de cada muestra para la determinación de citoquinas en circulación.

FIGURA 9: Esquema de manejo de muestras biológicas y análisis de poblaciones celulares en el Laboratorio de Inmunorregulación.



Las muestras de sangre se procesaron de forma inmediata a la extracción en el Laboratorio de Inmunoregulación dirigido por el Dr. Rafael Correa-Rocha. En éste laboratorio, se determinó la frecuencia y valor absoluto de las células T CD4+ y T CD8+ mediante citometría de flujo en un Citómetro Gallios (Beckmann Coulter, Francia) incluyéndose los marcadores para las células naíve o vírgenes (CD45RA+CD27+), activadas (HLA-DR+), memoria central o “Central-Memory CM” (CD45RA-CD27+), y memoria-efectoras EM (CD45RA-CD27-). Para obtener valores absolutos precisos de las distintas poblaciones, el análisis se hizo directamente en la muestra de sangre total sin lavados o manipulaciones que pudieran modificar los valores fisiológicos de estas células. Los porcentajes y valores absolutos de Treg en sangre periférica se analizaron midiendo las células CD3+CD4+CD25+CD127low. Dado que Foxp3 se considera el marcador definitivo que mejor define el fenotipo Treg, también se midió el porcentaje de células Foxp3+ reguladoras (CD3+CD4+CD25+Fosp3+) en células mononucleares de sangre periférica o PBMCs mediante el kit Anti-Human Foxp3 Staining Set (eBiosciences, San Diego, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analizaron también los subtipos de células T reguladoras Foxp3, TemRA (CD45RA+CD27-), memoria y RTE (CD45RA+CD27+CD31+) y el porcentaje y número absoluto de células B (CD19+CD3-) incluyendo los fenotipos naíve (CD27-IgD+), memoria non-switch (CD27+IgD+), memoria switch (CD27+IgD-) y

B reguladoras (CD24^{high}CD27^{high}). Respecto a los marcadores de B reguladoras, existe controversia en cuanto al fenotipo para identificar las Breg por lo que se ha usado varios de los publicados. Se midieron también basófilos (CD45^{low}CD123⁺IgE⁺), incluyendo los activados (CD63⁺). Los números absolutos de los subtipos de poblaciones inmunes se determinaron utilizando el "Flow-Count Fluorospheres Beckman-Coulter). Además, se midieron las células T CD4⁺ secretoras de citoquinas empleando PBMCs activadas durante 5 horas con Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50ng/ml) y Ionomicina (1µg/ml). Se realizó una tinción intracelular de estas células para IL-4, IFNγ y IL17 siguiendo las instrucciones del Cytotfix/cytoperm Kit (Beckton Dickinson).

Los niveles de Vitamina D se cuantificaron como 25-OH Vitamina D en el suero de la muestra del estudio por quimioluminiscencia. La cuantificación se realizó en el Laboratorio de Hormonas del Hospital Gregorio Marañón utilizando LIASON 25-OH-Vitamin D Total Assay en el analizador LIASON XL (DiaSorin, Stillwater,MN). Los valores se expresan en µg/L.

Tiempos del estudio: Se definieron una serie de tiempos de estudio en el que se recogieron distintos tipos de variables.

- **T0:** es el tiempo al diagnóstico de proctocolitis alérgica.
 - o **Inclusión de pacientes en T0** con recogida de variables clínicas y muestra de sangre para análisis inmunológico.
- **T resolución:** es el momento en el que se resuelve la sintomatología clínica tras la instauración del tratamiento. Se considera resolución a la desaparición por completo de toda la sintomatología previa del paciente.
 - o **Recogida de muestras en T resolución.** Estos pacientes se reclutan en T0 con recogida de variables clínicas este momento, pero no se extrae muestra de sangre para análisis inmunológico hasta que no se haya resuelto la sintomatología por completo tras el tratamiento (T resolución). No son los mismos pacientes incluidos en T0 sino otros pacientes incluidos en T resolución dado que por

protocolo y siguiendo las guías, no está indicado más de una extracción analítica en estos pacientes.

- **T1:** tiempo en el que se realiza la introducción de proteínas de leche de vaca en la dieta del paciente para valorar la posible tolerancia oral (a partir de los 9-10 meses según el caso).
 - **Recogida de variables clínicas y antropométricas.** No se recogen muestras biológicas para estudio inmunológico en este tiempo.
- **T2:** se define al tiempo en el que se considera resuelta la adquisición de tolerancia oral a PLV dado que el paciente ha tolerado la introducción de PLV en su dieta sin sintomatología.
 - **Recogida de variables clínicas y antropométricas.** No se recogen muestras biológicas para estudio inmunológico en este tiempo.

4.3. SUJETOS DE ESTUDIO

4.3.1. CASOS

Criterios de Inclusión: Niños diagnosticados de proctocolitis alérgica en consultas de Digestivo Infantil. El diagnóstico se basará en la historia clínica y exploración física compatible:

Definición de caso: “lactante sano de menos de 6 meses, con lactancia materna, mixta o fórmula adaptada que inicia cuadro de hematoquecia en heces (con o sin diarrea) sin alteración del estado general ni pérdida de peso”.

Criterios de Exclusión:

- Antecedente de prematuridad
- Pacientes con características clínicas que no sean las exclusivas de proctocolitis alérgica (Ej.: enterocolitis alérgica, fiebre, reflujo gastroesofágico, irritabilidad).

- Pacientes con resección intestinal.

4.3.2. CONTROLES SANOS:

Criterios de Inclusión: Lactantes sanos de las consultas o planta de Pediatría y Cirugía Pediátrica.

Criterios de Exclusión: Lactantes con cualquier enfermedad inflamatoria, infecciosa o gastrointestinal intercurrente.

4.4. VARIABLES DEL ESTUDIO

Las variables recogidas en el estudio fueron clínicas e inmunológicas y fueron las siguientes:

4.4.1. VARIABLES CLÍNICAS.

Se recogieron variables clínicas derivadas de la anamnesis, exploración física y del seguimiento de cada paciente enrolado en el estudio siguiendo la normativa de protección de datos de la Comunidad de Madrid.

VARIABLES CLÍNICAS:

1. **Variables epidemiológicas:** edad, sexo, fecha de inicio de sintomatología, fecha del diagnóstico de proctocolitis y fecha de extracción analítica.
2. **Variables clínicas en T0 (al diagnóstico):**
 - Clínica al diagnóstico (rectorragia, deposiciones líquidas, vómitos, rechazo del alimento, irritabilidad, fiebre >38°C, tiempo entre la ingesta y el inicio de sintomatología, tiempo de evolución del cuadro clínico, afectación del estado general, baja ganancia ponderal, palidez, edemas, exantemas).

La clínica de la proctocolitis alérgica se graduó según un **score clínico** que consiste en la suma de sintomatología clínica (rectorragia, deposiciones líquidas, vómitos, rechazo del alimento, irritabilidad, fiebre >38°C, afectación del estado general, baja ganancia ponderal, palidez, edemas,

exantemas) en el que cada síntoma se consideraba 1 punto. Este score clínico no está publicado ni validado, pero se crea para comparar los pacientes según la gravedad de la sintomatología dado que no existe una escala de gravedad validada en esta entidad clínica.

- Somatometría (peso, longitud, IMC) con percentiles y Z-score. Los sujetos del estudio son pesados y medidos en las consultas de Digestivo infantil desnudos o con ropa ligera, en posición en decúbito por ser pacientes menores de 2 años utilizándose para ello básculas homologadas modelo SECA gmbh 375®. La longitud de los pacientes menores de 2 años se obtuvo midiendo la distancia entre la parte superior de la cabeza y el talón, en posición horizontal con tallímetro ASMEDIC® modelo T101. El IMC se calculó según el cociente de peso/talla² (Kg/m²). Se registró el peso, talla e IMC según Z score calculado en función del valor actual – P50 o mediana de la población de referencia y dividido entre la desviación estándar de dicha población para la misma edad y sexo del paciente según las tablas de Carrascosa de 2010. Para la medición de Z score se utilizó la herramienta nutricional online de la web gastroinf.es validada por la Sociedad de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica.
 - Tipo de alimentación (lactancia materna, fórmula artificial o mixta), edad en día del primer biberón de fórmula adaptada.
 - Antecedentes personales: edad gestacional, somatometría neonatal, tipo de parto, eventos hipóxicos, periodo neonatal inmediato, dermatitis atópica.
 - Antecedentes familiares de atopia.
 - Pruebas de laboratorio: IgE total e InmunoCAP a proteínas de leche de vaca y fracciones. Se registró si fue necesario realizar otros estudios analíticos para el diagnóstico del paciente como: hemograma, bioquímica, gasometría, coagulación, coprocultivos.
3. **Tipo de tratamiento**: hidrolizado de proteínas de leche de vaca (HPLV) extenso, HPLV extenso y probioticoterapia (*Lactobacillus GG*), hidrolizado

de arroz o dieta materna exenta de PLV (en aquellos pacientes con lactancia materna exclusiva). El tratamiento médico se instauró a criterio del médico de Atención Primaria, Urgencias o Digestivo infantil, siguiendo las prácticas de clínica habitual.

4. Variables clínicas en TRESOLUCIÓN (al resolverse la sintomatología clínica): tiempo (días) hasta la resolución de la clínica completa de toda la sintomatología (rectorragia, irritabilidad leve, rechazo de tomas, vómitos), controles de somatometría en consultas, patologías intercurrentes. En el protocolo de manejo del paciente con proctocolitis alérgica de la Sección de Digestivo infantil que se siguió para el seguimiento de estos pacientes se estipularon las siguientes visitas:

- A los 15-20 días tras el diagnóstico y el inicio de tratamiento con dieta de exclusión de proteínas enteras de leche de vaca.
- Al mes si presentaba buena evolución clínica tras la instauración del tratamiento.
- Cada 2-3 meses hasta los 6-9 meses de tratamiento desde el diagnóstico.

5. Variables clínicas en T1 (antes de la introducción y valoración de tolerancia a proteínas de leche de vaca, a partir de los 9-10 meses según el caso). Edad (meses) y valores antropométricos (peso, talla e IMC).

6. Variables clínicas tras la tolerancia oral a PLV (T2): sintomatología tras la introducción de PLV (clínica de rectorragia, irritabilidad, rechazo de tomas, vómitos, otras), somatometría bimensual en controles en consultas, patología intercurrente. Edad (meses) de adquisición de tolerancia oral a PLV, tiempo (meses) desde el tratamiento hasta la adquisición de tolerancia oral.

4.4.2. VARIABLES INMUNOLÓGICAS.

- Análisis de células Treg: El marcaje de Treg se realizó en PBLs de sangre periférica usando la siguiente combinación de anticuerpos: CD4/CD25/CD45RA/FoxP3. Las células se incubaron con los anticuerpos de superficie durante 30 min, tras los cuales se procedió a la permeabilización de las células, marcaje de Foxp3 intracelular y adquisición en un citómetro de 5 colores (Beckman Coulter Cytomics FC500). Se adquirieron un mínimo de 40000 células T CD4+ y se seleccionarán las células CD4+/CD25+/FoxP3+ que definen la población de Treg. En todos los casos se incluyó un tubo con los correspondientes controles isotípicos para definir las poblaciones negativas o positivas.

- Análisis de subpoblaciones de células inmunes: Además de las Treg, se analizaron por citometría las poblaciones de células B, linfocitos T CD4 y CD8 y células NK para determinar el estado inmunológico de los niños. Dentro de estas poblaciones también se analizarán marcadores inmunofenotípicos de activación, células naïve, memoria y efectoras. Se determinará tanto el porcentaje como número absoluto de las distintas poblaciones.

Tabla 2: Poblaciones inmunológicas (variables inmunológicas) analizadas en el estudio:

Linfocitos T	- Nº absoluto y porcentaje de CD3+, linfocitos DP (dobles positivas CD4+, CD8+)
Linfocitos T CD4+	- Nº absoluto y porcentaje de: CD4+, CD4+38DR+, CD4+38+, CD4 Act, CD4CM, CD4EM, CD4 naïve, CD4TemRa, CD4 RTE.
Linfocitos T Reg	- Nº absoluto y porcentaje de: Treg, Treg38DR+, Treg38+, TregAct, TregCM, TregEM, Treg naïve, Treg TemRa y TregRTE.

Panel FoxP3 (T reg)	- N° absoluto y porcentaje de: Foxp3+, TregCTLA4+extracelular, TregCTLA4+intracelular, TregCD39+, MFI Foxp3+, Treg naïve, Treg TMem y TregRTE.
Linfocitos T CD8+	- N° absoluto y porcentaje de: CD8+, CD8Act, CD8CM, CD8EM, CD8naïve, CD8naïve++, CD8TemRA
Linfocitos B	- N° absoluto y porcentaje de: LinfocitoB CD19+, Linfocito B MemCD27-, LinfBMemNS, LinfBMemS, LinfBnaïve, plasmablastos
B reguladoras	- N° absoluto y porcentaje de: Br1, CD25+CD73-, Br1Real, Breg-I, Breg-II
Granulocitos	- N° absoluto y porcentaje de: Granulocitos, basófilos, basófilos act, BasófCD63++, Basófilos IgE+, Neutrófilos, eosinófilos
Células dendríticas	- N° absoluto y porcentaje de: Dendríticas, CD11c-, mDC2, mDC1, mDC16+, dendríticas mieloides, dendríticas plasmacitoides
Células NK	- N° absoluto y porcentaje de: NK totales, NK16+56++, NK16+56+, NK 16+56-, NKT, Tfh, CD4gd, CD8gd, DPgd, DNgd
Monocitos	- N° absoluto y porcentaje de: Monocitos, MonocInflamatorios14++16+, MonocInflamatorios14+16++, monocitos clásicos

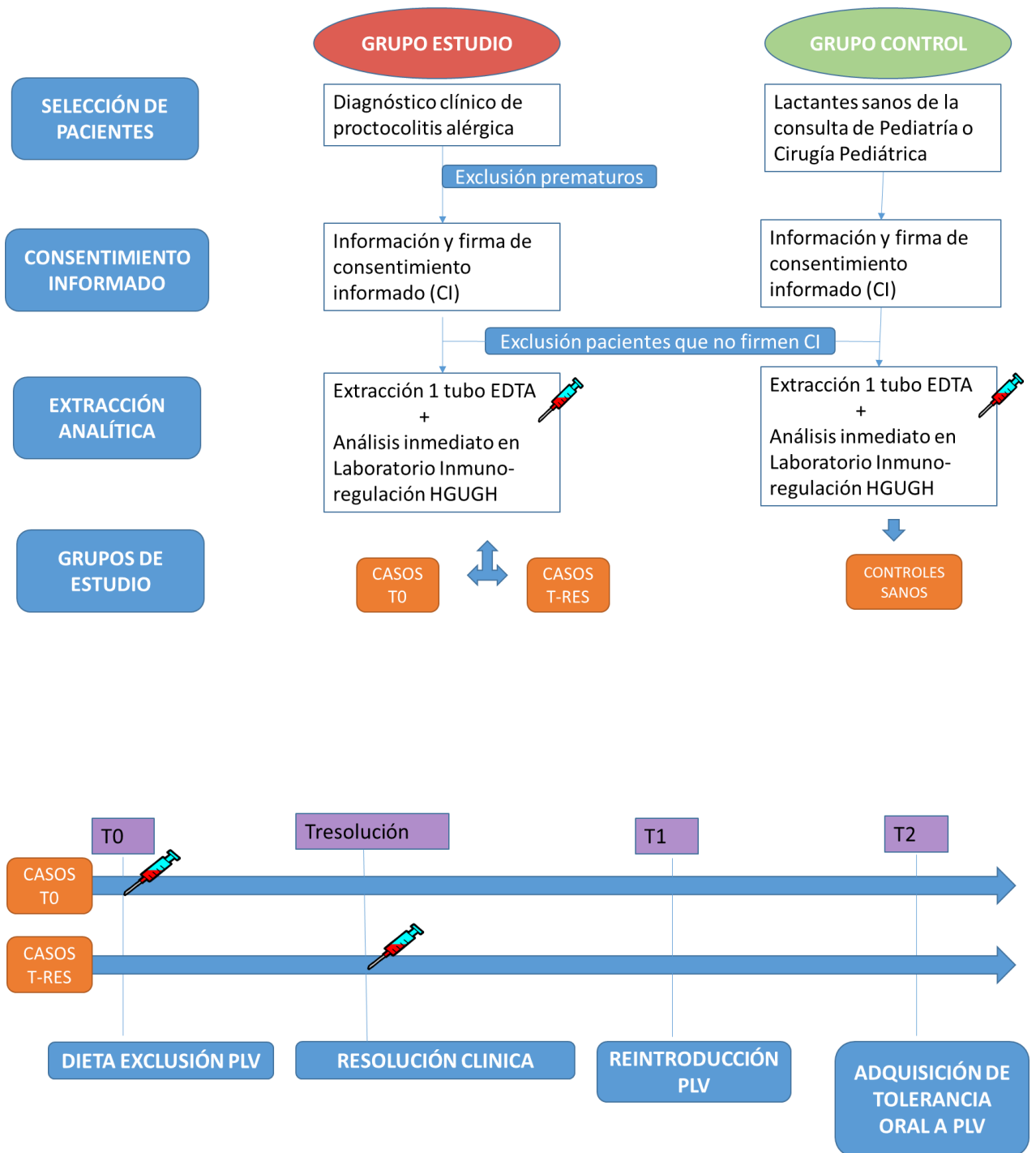
Células T CD4+ productoras de citoquinas Th1, Th2, Th17	<ul style="list-style-type: none"> - Sobre linfocitos T CD4+ vivos: IFNγ, IL-17+, IL4+, IL4+/IFN-g+, IL4+total - Sobre linfocitos T CD4+ activados: IFNγ, IL-17+, IL4+, IL4+/IFN-g+, IL4+total
Ratios T reg	<ul style="list-style-type: none"> - % y n$^{\circ}$ absoluto Treg/ CD4CM - % y n$^{\circ}$ absoluto Foxp3/CD4CM - % y n$^{\circ}$ absoluto Treg/ CD4EM - % y n$^{\circ}$ absoluto Foxp3/ CD4EM - % y n$^{\circ}$ absoluto Treg/ CD4TemRA - % y n$^{\circ}$ absoluto Foxp3/ CD4TemRA

(RTE: recién emigradas del timo; Naïve: vírgenes; Act: activadas; EMem: efectoras-memoria; CMem: memoria-central; TemRA: efectoras muy diferenciadas; MemNS: células B memoria non-switch; MemS: células B memoria switch; Reg: reguladoras; mDC: células dendríticas mieloides).

- Niveles de Vitamina D cuantificada como 25-OH Vitamina D.

A continuación, se expone un resumen de la metodología del estudio y un esquema del seguimiento clínico en la Figura 10.

FIGURA 10: Esquema de la metodología del estudio



4.5. CRONOGRAMA

En la primera fase del proyecto, con una duración de 3 años se recopilaban las muestras de sangre procedente de los niños diagnosticados de proctocolitis

alérgica, así como de los niños que forman el grupo control. Las muestras se procesaron en el mismo día inmediatamente después de su extracción y se realizaron los estudios de citometría para cuantificar las distintas poblaciones inmunes incluyendo las Treg, y los estudios funcionales para determinar la capacidad supresora de estas Treg.

En una segunda fase, a partir del tercer año, se completó el seguimiento de los niños incluidos en el estudio hasta toleraron la proteína de la leche de vaca de forma completa tras su reintroducción.

Las variables inmunológicas se correlacionaron con la clínica para establecer el carácter pronóstico o predictivo de los marcadores analizados y se realizó un análisis estadístico para establecer las correlaciones entre los parámetros clínicos y las poblaciones estudiadas.

FIGURA 11. Esquema del cronograma del estudio



4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El estudio estadístico se realizó en la Unidad de Metodología y Bioestadística de la Fundación para la Investigación del Hospital Universitario Gregorio Marañón de Madrid. Esta Unidad es un Servicio de Apoyo a la Investigación que realiza tareas de asesoramiento metodológico y estadístico dirigido a investigadores del hospital.

Se realizó el análisis estadístico de los datos recogidos con el programa estadístico SPSS, versión 21 y el programa Stata versión 8 SE.

En primer lugar, se realizó un estudio descriptivo de los casos y controles. Las variables cuantitativas se expresaron como media y desviación estándar o mediana y rango intercuartílico, según la distribución normal o no de la muestra. Las variables cualitativas se expresaron como porcentajes. Se comparará en primer lugar las características basales (edad y sexo) de los sujetos en los distintos grupos del estudio (casos T0, casos Tresolución y controles) para analizar si estos grupos son comparables.

A continuación, se realizó un estudio analítico del resto de variables recogidas en T0 y en Tres y se comparará con el grupo control. Para comparar las variables categóricas se utilizaron los test de Chi cuadrado. Para las variables continuas la U de Mann Whitney y el test de Kruskal Wallis. Para evaluar la mediana de tiempo en resolverse la sintomatología de la proctocolitis desde el inicio del tratamiento se construyó una curva de supervivencia Kaplan-Meier. Se analizó la posible correlación mediante la prueba estadística Rho de Spearman entre el score clínico y distintas variables cuantitativas clínicas e inmunológicas. Para el estudio de correlación con variables categóricas se utilizó test estadístico U de Mann Whitney (si se comparaban 2 grupos) o Kruskal-Wallis (si se comparaban 3 grupos o más). Para analizar la correlación de las células T reguladoras y otros marcadores inmunológicos con el resto de poblaciones inmunes se realizó un estudio de correlación de Pearson.

Por último, se calcularon las áreas bajo la curva ROC, utilizando el programa Stata, para evaluar la capacidad diagnóstica (sensibilidad y especificidad) de los marcadores inmunológicos encontrados en el estudio.

Todas las pruebas estadísticas se han considerado significativas si el valor de $p < 0.05$.

4.7. ASPECTOS ÉTICOS Y PROTECCIÓN DE LOS SUJETOS PARTICIPANTES

EVALUACIÓN BENEFICIO-RIESGO

El beneficio esperado del estudio es la adquisición de conocimientos derivados del estudio. No existen riesgos para el sujeto participante derivados de la inclusión en el estudio.

INFORMACIÓN A LOS SUJETOS Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Este estudio se realizó respetando los principios y las normas éticas básicas que tienen su origen en la actual revisión (versión revisada de Fortaleza, 2013) de la Declaración de Helsinki, el Convenio de Oviedo, y con los requisitos reguladores vigentes recogidos la legislación española (normativa básica: Ley 29/2006 de 26 de Julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios y Ley 14/2007 de 3 de julio, de investigación biomédica; y específica: orden SAS 3470/2009).

No hubo compensaciones económicas para los sujetos participantes previstas en este estudio. La información a los sujetos participantes, a los familiares o a los representantes legales según proceda, se dio verbalmente, explicando los distintos apartados del protocolo. Se entregó una copia de la hoja de información al paciente (HIP) y del consentimiento informado y se dio tiempo para que este fuera revisado antes de su firma por quien proceda. Antes de comenzar el estudio, el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIm) aprobó y dio su opinión favorable al protocolo y a todas sus enmiendas, así como al consentimiento informado del paciente. (CEIC 61/12).

CONFIDENCIALIDAD DE DATOS

La información recogida para el estudio fue tratada siguiendo lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal, posteriormente Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, el reglamento General de protección de datos (Reglamento 2016/679) y la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

RECURSOS Y FINANCIACIÓN

Este estudio recibió financiación de la Beca SEICAP (Sociedad Española de Inmunología Clínica, Alergología y Asma Pediátrica) y de ayudas económicas del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) co-financiadas por los fondos FEDER (PI12/00934;IC14/00282) destinadas al análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo.



CAPÍTULO 5: RESULTADOS

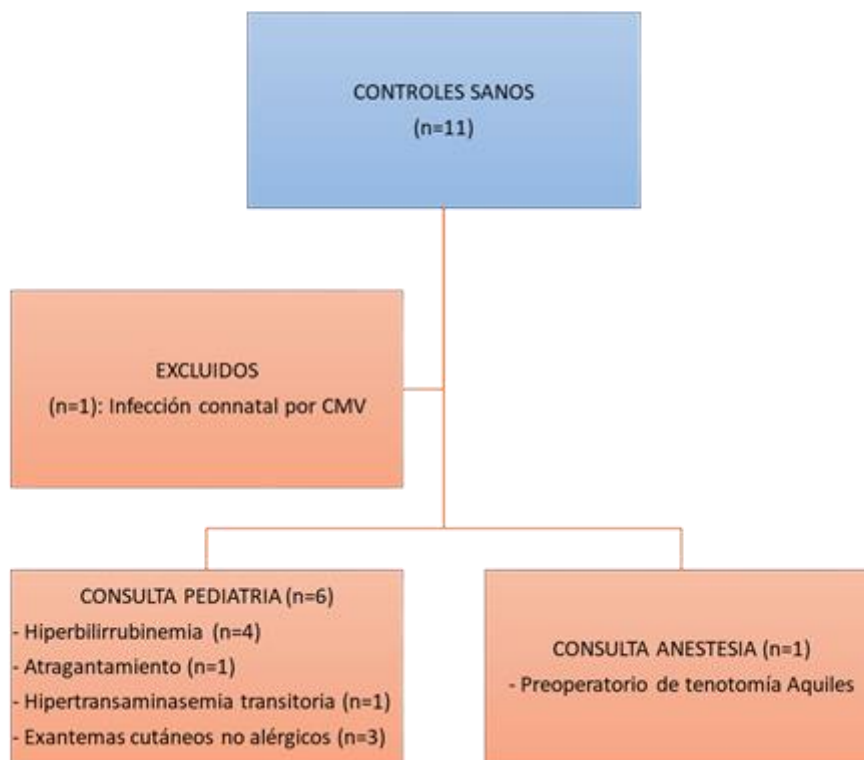
5.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Durante el periodo de estudio 2015-2018 reclutaron 32 pacientes con proctocolitis: 22 proctocolitis en fase aguda o T0 y 10 proctocolitis en fase de resolución. Además, se reclutaron 10 controles sanos de las consultas de pediatría y anestesia infantil como grupo control.

5.1.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DEL GRUPO CONTROL

Se recogieron 11 controles sanos de las diferentes consultas (Figura 12), pero se excluyó uno por confirmarse posteriormente infección connatal por citomegalovirus.

FIGURA 12: Reclutamiento de pacientes del grupo control (sanos).

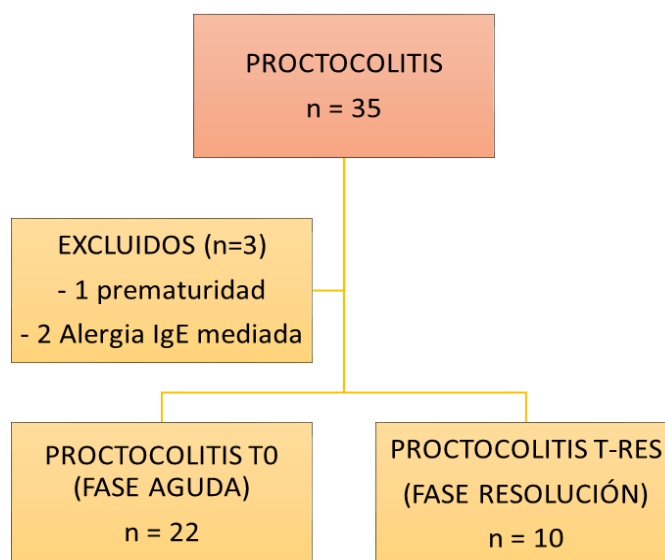


Ningún paciente del grupo control tenía antecedentes personales de prematuridad.

5.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON PROCTOCOLITIS

Se recogieron 35 pacientes con proctocolitis. Se excluyeron 3 pacientes del estudio por prematuridad o por confirmarse posteriormente alergia mediada por IgE (Figura 13).

FIGURA 13. Reclutamiento de pacientes de grupo proctocolitis.



Las características clínicas de los pacientes al diagnóstico se resumen en la tabla 3. Se realizó un test de normalidad. Si las variables tenían una distribución normal se expresan en medias y su desviación estándar. Si las variables tenían una distribución no normal se expresan en medianas y percentil 25-75.

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes con proctocolitis.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	N=32 casos
Género	50% varones; 50% mujeres
Mediana de edad de inicio de síntomas (meses)	1,45 (0,9-2,27)
Mediana de edad al diagnóstico (meses)	2,2 (1,2-4,0)
Tiempo de evolución de los síntomas hasta la valoración en consultas (días)	14 días (2-20)
Presencia de rectorragia	100%
Diarrea	8/32 (25%)

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	N=32 casos
Vómitos	5/32 (15,6%)
Rechazo de alimentación	3/32 (9,3%)
Irritabilidad	12/32 (37,5%)
Baja ganancia de peso	5/32 (15,6%)
Palidez	1/32 (3%)
Exantema	N=4 (12,5%)
SCORE CLÍNICO <i>(cada sintomatología previa suma 1 punto)</i>	Media 2,36±1,38 Niños con puntuación 1: 34,4% Niños con puntuación 2: 28% Niños con puntuación ≥ 3: 37,6%
Tiempo desde la ingesta del 1º biberón hasta el inicio de la sintomatología	0,5 días (0-21,25)
Tipo de alimentación	65.5% lactancia materna 9.4% lactancia artificial 25% lactancia mixta
Tipo de parto	26.7% vaginal eutócico 3.3% vaginal instrumentado 30% cesárea
Antecedentes personales de dermatitis atópica	6.7%
Antecedentes familiares de atopia	41.9%
Parámetros antropométricos al diagnóstico (mediana)	Peso: 5,2±0,45 kg (p27) Longitud: 57±0,28 cm (p59) IMC: 14.4±0,86 (p19.5)
Pruebas inmunológicas	Negativas
- IgE total	0.15±0.62 KU/L
- InmunoCAP:	
- IgE leve de vaca	0.029±0.06 KU/L
- IgE alfa lactoalbúmina	0.009±0.026 KU/L
- IgE beta lactoglobulina	0.02±0.066 KU/L
IgE caseína	0.015±0.029 KU/L

Se realizó analítica de sangre en T0 con hemograma y bioquímica a 8 pacientes (ver tabla 4), 10 precisaron cultivos de heces para descartar patología infecciosa intercurrente (el 100% de los cultivos fueron negativos) y en 4 pacientes se realizó ecografía abdominal para descartar enterocolitis con resultado normal en todos ellos.

Tabla 4. Hallazgos analíticos de los casos de proctocolitis en los que se realizó hemograma y bioquímica.

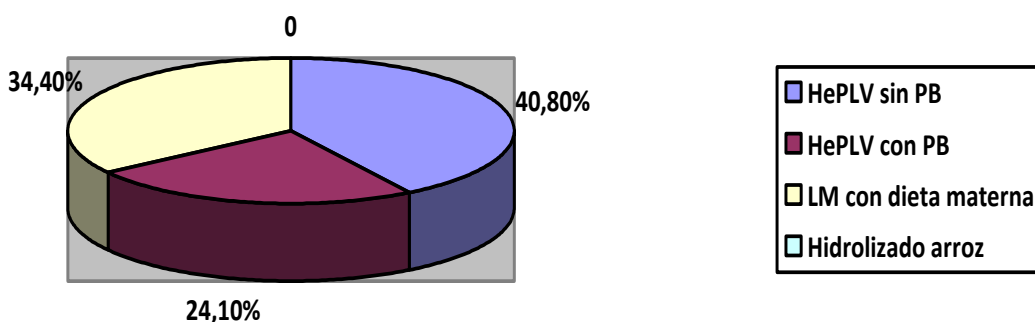
HALLAZGOS ANALÍTICOS	N =8 casos	Alteraciones patológicas
Hemoglobina	11,35±1,26 g/ dL	Anemia (<10,5): 3/8
VCM	86,18±9,49 mm ³	Microcitosis: 1/8
Plaquetas	357,000±84652 mm ³	Trombocitosis: 1/8
Leucocitos media	10457±3711 mm³	Leucocitosis: 3/8
-neutrófilos	3557±3086 mm ³	Neutrofilia: 2/8
-linfocitos	5671±1307 mm³	Linfocitosis: 5/8
-Eosinófilos	400±303 mm³	Eosinofilia: 3/8
-Basófilos	16,6±40 mm ³	Elevados: 1/8
-Monocitos	1033±571 mm³	Monocitosis: 6/8
Glucosa	82,5±21,3 mg/dL	Hipoglucemia: 1/8
AST (elevado >32 mU/mL)	60±42,8	elevado en 6/8
ALT (elevado >33 mU/mL)	42,8±26	elevado en 4/8
Proteínas (bajo < 6 g/dL)	5,72±0,31	bajo en 3/8
Albúmina (bajo <3.5g/dL)	4,15 ± 0,07	normal
PCR mg/dL	0,025±0,05	normal

5.1.3. TRATAMIENTO DE LA PROCTOCOLITIS

Los pacientes con proctocolitis recibieron distintos tipos de tratamiento en función de la alimentación que tuvieran previamente. La mayoría, un 40,8% de los pacientes, recibieron hidrolizado extenso de proteínas de leche de vaca sin probióticos (HePLVsinPB). Todos los pacientes que previamente estaban con

lactancia materna exclusiva continuaron con esta alimentación, pero con dieta materna de restricción de proteínas de leche de vaca. En ninguno de éstos se tuvo que suspender la lactancia materna. Ningún paciente recibió hidrolizado de arroz.

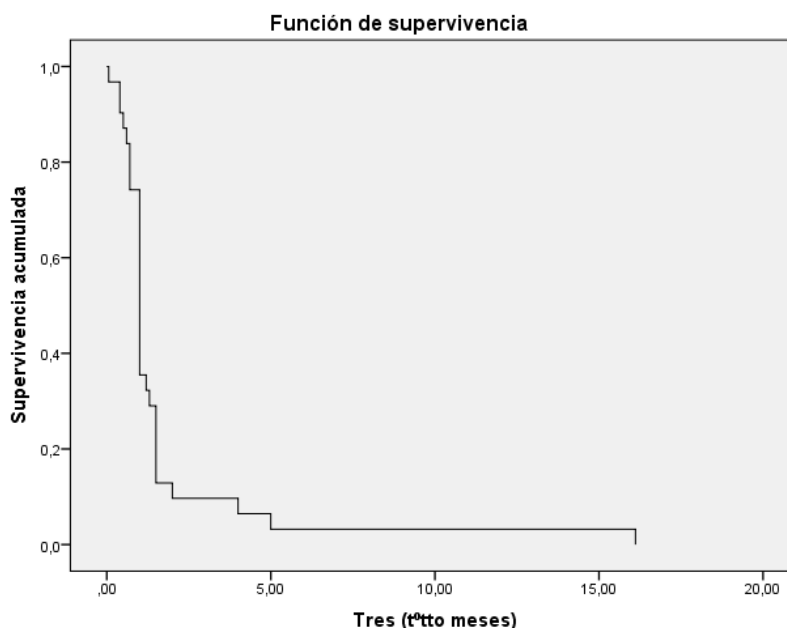
FIGURA 14. Tipos de tratamiento de exclusión de proteínas de leche de vaca administrado en los pacientes con proctocolitis.



5.1.4. EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES

En cuanto a la evolución de los pacientes, la mediana de edad de resolución de la sintomatología con el tratamiento fue de 3,2+/-1,78 meses. La sintomatología de los pacientes tarda en resolverse tras el tratamiento una mediana de tiempo de 1 mes (0,8-1,1). Este resultado se expresa en la curva de supervivencia Kaplan-Meier (Figura 15).

FIGURA 15. Mediana de tiempo de resolución de la sintomatología tras la introducción de tratamiento.



La edad media de la reintroducción de las proteínas de leche de vaca (T1) fue de $10,3 \pm 2$ meses; y la edad media de adquisición de tolerancia clínica a las PLV (T2) fue de $14,6 \pm 3,34$ meses.

En 10 pacientes se retrasó la reintroducción de proteínas de leche de vaca por aparición de sintomatología intercurrente (estreñimiento, cólicos, gastroenteritis viral). El seguimiento de los pacientes se perdió en un 18,7%, el resto de los pacientes (n=22), toleran en la actualidad la proteína entera de leche de vaca.

En cuanto al estado nutricional de los pacientes en los distintos tiempos del estudio, se observa una mejoría estadísticamente significativa de los parámetros antropométricos de éstos (medido por IMC según edad) tras el tratamiento con dieta de exclusión (Tabla 5).

Tabla 5. Valores antropométricos de los pacientes con proctocolitis en los distintos tiempos de evolución clínica.

Tiempos evolutivos	Mediana de IMC (valor; percentil; Zscore)	<i>p</i>
T0 (n=32)	14,4; p19,5; -0.86	

Tiempos evolutivos	Mediana de IMC (valor; percentil; Zscore)	<i>p</i>
Tres (n=32)	15,9; p27; -0,44	0,001*
T1 (n=25)	16,3; p26; -0,63	<0,001*
T2 (n=22)	16,5; p28; -0,57	0,020*

(*: Diferencias estadísticamente significativas)

5.1.5. COMPARACIÓN DE CASOS DE PROCTOCOLITIS RECOGIDOS EN T0 CON LOS RECOGIDOS EN FASE RESOLUCIÓN

Se recogieron 22 pacientes con proctocolitis en fase aguda (T0) y 10 se reclutaron en fase de resolución (Tres). Los pacientes no fueron los mismos recogidos en distintos tiempos. La comparación de variables clínicas en estos pacientes no muestra diferencias estadísticamente significativas por lo que los grupos son comparables (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de variables clínicas de los pacientes con proctocolitis (T0 y Tres).

VARIABLES CLÍNICAS	Reclutados en T0 (n=22)	Reclutados en Tres (n=10)	Significación estadística (<i>p</i>)
Género mujer	45,5%	60%	0,446
Score clínico al diagnóstico (media)	2,23±1,37	2,6±1,43	0,458
<ul style="list-style-type: none"> • Sólo rectorragia • 2 puntos • 3 o más puntos 	36,4% 31,8% 31,8	30% 20% 50%	0,705
Tipo de alimentación previa			0,395
<ul style="list-style-type: none"> • Lactancia materna • Lactancia artificial • Lactancia mixta 	72,7% 9,1% 18%	50% 10% 40%	

VARIABLES CLÍNICAS	Reclutados en T0 (n=22)	Reclutados en Tres (n=10)	Significación estadística (p)
Antecedente de ingesta de biberón	61,9%	60%	0,919
Tipo de parto			0,771
• vaginal eutócico	35%	50%	
• vaginal instrumentado	30%	20%	
• cesárea	5%	0%	
Dermatitis atópica	10%	0%	0,301
Antecedente familiar de atopia	47,6%	30%	0,353
Tipo de tratamiento para proctocolitis			0,724
• HePLV sin PB	4,5%	0%	
• HePLV con PB	4,5%	10%	
• LM exenta	36,4%	30%	
• HePLV sin PB y LM	31,8%	50%	
• HePLV con PB y LM	22,7%	10%	
Edad en meses (media)	2,43±1,34	3,69±2,5	0,163
Edad de inicio de los síntomas	1,7±1,1	1,61±1,2	0,795
Tiempo de evolución de clínica (media de días)	13,86±13,1	14,78±23	0,605
IMC al diagnóstico (mediana Zscore)	-0,82	-1,83	0,5
Edad de resolución de clínica (Tres)	3,5±1,87	2,7±1,51	0,393
Edad de reintroducción de PLV	10,6±2,2	9,5±1,61	0,141
Edad de adquisición de tolerancia	14,56±3,14	14,66±4,17	0,494

5.1.6. COMPARACIÓN DE CASOS-CONTROLES EN CUANTO A CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASALES

La media de edad de los casos de proctocolitis en fase aguda (T0) fue de 2.48 meses y la de los controles de 2.93 meses sin diferencias significativas. No se observan diferencias significativas con el sexo entre estos dos grupos. Tampoco se observan diferencias significativas entre la edad y sexo de los pacientes con proctocolitis T0 con respecto a las proctocolitis en resolución (Tres) ni de éstos respecto al grupo control. (Tabla 7, 8 y 9).

Tabla 7. Comparación de características basales (edad y género) entre proctocolitis en fase T0 y pacientes sanos del grupo control.

	T0 (n= 22)	Control (n= 10)	p
Edad (meses)	2,43 ± 0,29	2,47 ± 0,63	0,675
Género (%varones)	54,5 % (12/22)	50 % (5/10)	0,598

Tabla 8. Comparación de características basales entre proctocolitis en fase T0 y T resolución.

	T0 (n= 22)	T resolución (n= 10)	p
Edad (meses)	2,43 ± 0,29	3,79 ± 0,81	0,163
Género (%varones)	54,5 % (12/22)	40 % (4/10)	0,288

Tabla 9. Comparación de características basales (edad y género) entre proctocolitis en fase T resolución y pacientes sanos del grupo control

	T resolución (n= 10)	Control (n= 10)	p
Edad (meses)	3,79 ± 0,81	2,47 ± 0,63	0,165
Género (%varones)	40 % (4/10)	50 % (5/10)	0,710

5.2. ESTUDIO INMUNOLÓGICO DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO

Se analizaron las distintas variables inmunológicas de los pacientes y posteriormente se realizaron estudios de correlación de las células T reguladoras con las variables inmunológicas previamente descritas.

A continuación, se expone los resultados del análisis de las distintas variables inmunológicas en los tres grupos de pacientes del estudio (proctocolitis T0, proctocolitis T resolución y controles sanos).

5.2.1. POBLACIONES LINFOCITARIAS

Los valores globales de las diferentes poblaciones linfocitarias (células B, T) asociadas a la inmunidad adaptativa no aparecen alteradas en proctocolitis alérgica en ninguno de los tiempos de estudio (T0 o T resolución) con respecto a los controles sanos (Tablas 10 y 11). Los resultados se expresan en medias para poder realizar la comparación posteriormente con las medias publicadas de poblaciones linfocitarias en otras enfermedades alérgicas.

Tabla 10. Comparación de porcentaje de poblaciones linfocitarias en casos de proctocolitis en distintos tiempos (T0 o T resolución) frente a controles.

POBLACIONES LINFOCITARIAS (%)	CASOS T0 (n=22)	CASOS T res (n=10)	CONTROLES (n=10)	p
Células T totales (CD3+)	61,27±8,4	61,7±8,39	62,7±7,44	0,85
T-DP CD4+,CD8+	0,14±0,19	0,07±0,09	0,05±0,07	0,014*
Células TCD4+	46,22±7,33	45,33±8,06	47,72±6,94	0,889
CD4_38DR	0,72±0,35	0,72±0,26	0,59±0,25	0,388
CD4_38	82,33±3,6	80,7±5,67	82,66±4,0	0,646
-naïve	85,89±3,07	86,20±4,90	87,19±3,19	0,305
-central memory (CM)	10,68±2,50	10,01±4,35	9,08±2,19	0,204
-Efectoras (TemRA)	0,07±0,06	0,08±0,08	0,18±0,22	0,345
-Activadas (Act)	0,54±0,43	0,56±0,36	0,51±0,38	0,952
-RTE	72,23±4,98	72,76±8,35	79,4±5,58	0,007*

POBLACIONES LINFOCITARIAS (%)	CASOS T0 (n=22)	CASOS T res (n=10)	CONTROLES (n=10)	p
-Eectoras memoria (EM)	0,36±0,22	0,43±0,22	0,40±0,47	0,251
Células Treg	7,6±1,52	7,00±1,52	7,49±1,33	0,67
Treg_38DR	4,89±2,9	4,80±2,88	1,6±1,03	0,003*
Treg_38	55,53±6,5	51,38±5,33	56,86±5,6	0,366
-naïve	69,75±5,38	72,28±8,56	73,83±6,46	0,058
-central memory (CM)	25,35±4,99	22,47±7,83	20,81±5,35	0,031*
-Eectoras (TemRA)	0,09±0,06	0,07±0,04	0,33±0,58	0,345
-Activadas (Act)	2,96±2,39	2,58±1,18	2,76±1,67	0,984
-RTE	53,79±4,08	55,87±8,84	63,18±8,04	0,007*
-Eectoras memoria (EM)	0,75±0,36	0,94±0,44	1,09±1,19	0,857
Treg Foxp3	7,03±1,39	5,89±1,22	6,68±1,43	0,588
Foxp3 Activadas	5,06±3	4,7±3	4,9±3,3	0,887
Foxp3_CD39	1,8±1,37	3,6±3,3	3,6±6,7	0,661
Foxp3_memoria	41,23±19,2	37,86±17,24	33,62±8,4	0,288
Foxp3_Naïve	58,2±19	61,38±17	65,57±8,1	0,288
Foxp3_RTE	41,07±14,2	44,94±14	51,3±7,6	0,043*
Células TCD8+	13,88±4,25	13,72±4,53	12,8±2,64	0,589
-naïve	88,74±9,05	87,15±10,82	87,16±10,76	0,857
-central memory (CM)	7,78±5,23	5,89±3,10	7,68±5,05	0,889
-Eectoras (TemRA)	0,95±2,41	3,78±7,75	1,77±2,75	0,388
-Activadas (Act)	1,07±2,25	1,22±2,31	1,38±2,32	0,535
-Eectoras memoria (EM)	0,5±1,6	0,7±1,22	0,81±1,59	0,562
Células B CD19+	22,88±7,21	21,04±8,29	22,62±9,17	0,826
Naïve	93,47±2,06	92,34±3,63	93,57±1,53	0,920
Memory switch	0,87±0,56	10,7±0,63	0,75±0,52	0,482
Memory non-switch	2,68±1,41	2,13±0,68	2,84±1,34	0,704
Breguladoras (BR1)	13,08±6,46	8,83±2,51	7,19±3,71	0,010*
BR1 Real	0,09±0,037	0,08±0,04	0,04±0,01	0,002*

POBLACIONES LINFOCITARIAS (%)	CASOS T0 (n=22)	CASOS T res (n=10)	CONTROLES (n=10)	p
Breg I	0,65±0,25	0,83±0,33	0,63±0,20	0,974
Breg II	31,76±7,24	27,23±10	29,32±8,9	0,671
Mem CD27-	2,97±1,36	4,43±3,53	2,8±1,07	
Plasmablastos	0,71±0,44	0,96±0,94	0,68±0,71	0,341

(*=Parámetro inmunológico con significación estadística). Los porcentajes para cada población celular se calculan de acuerdo al total de la población celular correspondiente (total de linfocitos, total de células TCD4+, total de células TCD8+, total de células B)

Tabla 11. Comparación de nº absoluto de poblaciones linfocitarias en pacientes con proctocolitis en distintos tiempos (T0 o T resolución) frente a controles.

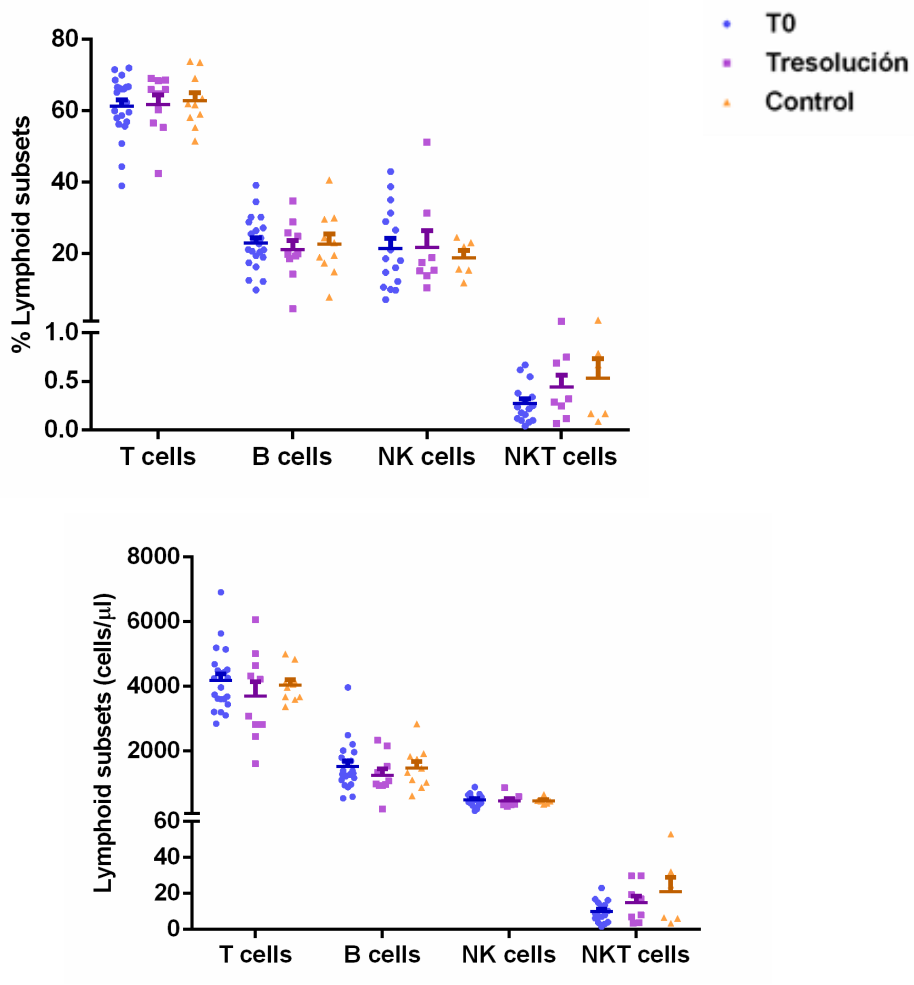
POBLACIONES LINFOCITARIAS (Nº absoluto, cél/µl)	CASOS T0 (n=22)	CASOS T res (n=10)	CONTROLES (n=10)	p
Células T (CD3+)	4.183±950	3.706±1.363	4.045±527	0,857
T-DP (CD4+,CD8+)	6,69±9,6	3,22±4,4	2,19±3,17	0,009*
Células TCD4+	3181±849	2960±995	3089±559	0,675
CD4_38DR	23,81±14,1	18,13±6,3	17,94±7,89	0,366
CD4_38	2.627±743	2.208±920	2.549±475	0,826
-naïve	2737±760	2346±1006	2695±529	0,920
-central memory (CM)	337±109	246±83	277±69	0,026*
-Eectoras (TemRA)	2,31±1,61	2,17±2,89	5,85±6,9	0,305
-Activadas (Act)	18,22±18,6	12,94±5,39	15,97±0,98	0,984
-RTE	2353±710	2007±952	2383±437	0,977
-EM	11,16±5,8	10,34±5,7	13,4±16,22	0,235

POBLACIONES LINFOCITARIAS (Nº absoluto, cél/µl)	CASOS T0 (n=22)	CASOS T res (n=10)	CONTROLES (n=10)	p
Células Treg	244,83±86,07	177,16±48,24	230,13±49,96	0,857
Treg_38DR	5,30±4,3	2,69±1,44	3,7±2,38	0,235
Treg_38:	138,4±61,6	91,7±29,7	132,06±36,4	0,764
-naïve	171,28±64,29	131,21±45,53	170,56±41,9	0,704
-central memory (CM)	61,45±23,4	36,68±15,21	47,2±13,31	0,100
-Efectoras (TemRA)	0,22±0,18	0,12±0,09	0,83±1,49	0,483
-Activadas (Act)	7,48±8,04	4,44±1,90	6,05±3,67	1
-RTE	132,08±47,6	101,9±38,9	135,5±30,1	0,475
-EM	1,75±0,9	1,64±0,73	2,66±3,16	0,984
T reg Foxp3	214,7±58,4	122,98±78,9	156,1±101	0,194
Foxp3 Activadas	10,77±8,9	5,38±3,7	7,1±5,35	0,440
Foxp3_CD39	3,7±2,7	3,7±3,7	5,1±5,2	0,913
Foxp3_memoria	87,69±47,4	46,1±27,34	55,9±40,3	0,175
Foxp3_Naïve	125,75±54	75,27±60	97,9±66	0,475
Foxp3_RTE	88,3±38,4	55,9±47	78,6±56,9	0,798
Células TCD8+	925±225	843±391	817±119	0,100
-naïve	815±198	673±300	707±106	0,092
-central memory (CM)	75,08±61,37	42,34±27,44	64,39±45,1	0,675
-Efectoras (TemRA)	9,10±22,29	44,88±105,9	15,96±25,59	0,509
-Activadas (Act)	11,38±27,64	10,37±20,27	12,23±21,03	0,366
-EM	5,59±19,6	7,6±14,7	7,2±14,1	0,458

POBLACIONES LINFOCITARIAS (Nº absoluto, cél/μl)	CASOS T0 (n=22)	CASOS T res (n=10)	CONTROLES (n=10)	p
Células B CD19+	1526±739	1246±629	1474±643	0,509
Naïve	1430±710	1160±601	1383±613	0,920
Memory switch	13,00±9,19	11,63±7,9	10,34±7,68	0,483
Memory non-switch	38,01±21,4	28,69±22,73	42,42±28,69	0,704
Breguladoras (BR1)	1,17±0,47	1,06±0,87	0,63±0,43	0,01*
Breg I	8,65±3,5	10,27±7,2	9,3±4,8	0,974
Breg II	432,4±186	298,9±154	407,4±184	0,769
Plasmablastos	9,79±6,96	7,86±3,69	7,34±4,5	0,452

(*=Parámetro inmunológico con significación estadística).

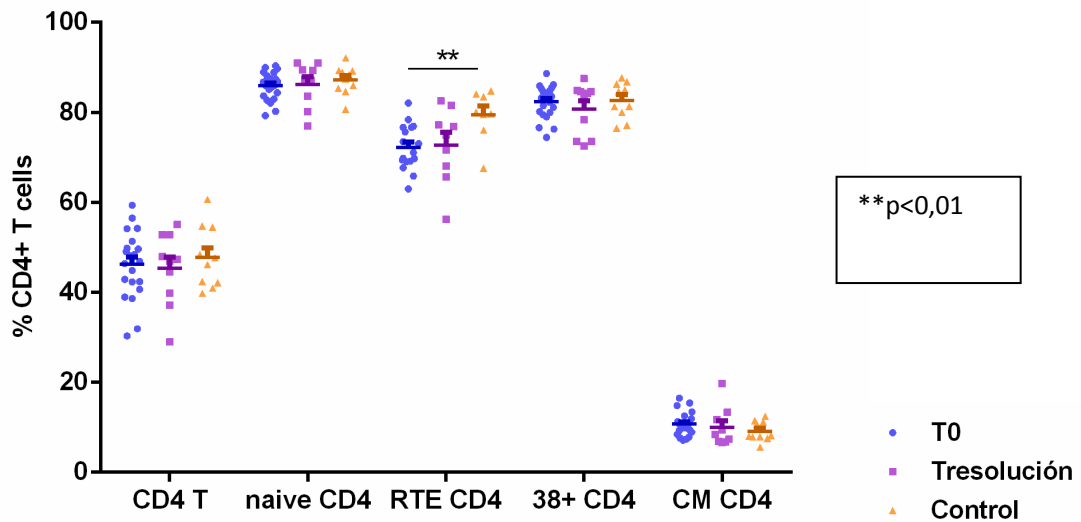
FIGURA 16. Comparación de poblaciones linfocitarias según grupos de pacientes.

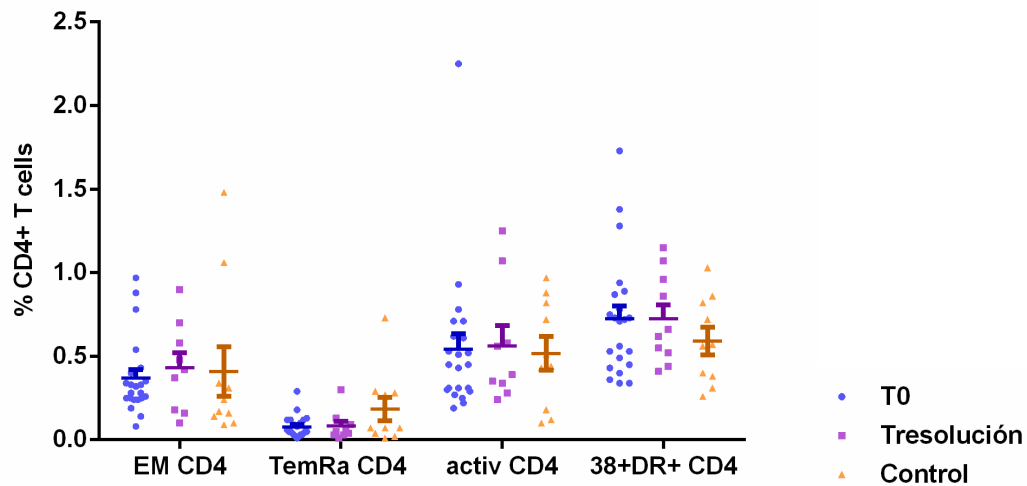


5.2.2. ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS T-CD4

En la mayoría de las subpoblaciones de células T-CD4 no existe diferencias significativas con respecto a los controles (Figura 17). Sin embargo, esto no ocurre en la población de células T CD4+ RTE que son células T CD4 recientemente producidas en el timo (marcador de producción tímica). En éstas se observa que el porcentaje (aunque no el valor absoluto) son más bajos en niños con proctocolitis alérgica (en T0 y res) respecto a los controles ($p < 0.01$). Esto reflejaría una producción tímica de nuevas células T disminuidas o una mayor diferenciación de las mismas hacia los demás fenotipos.

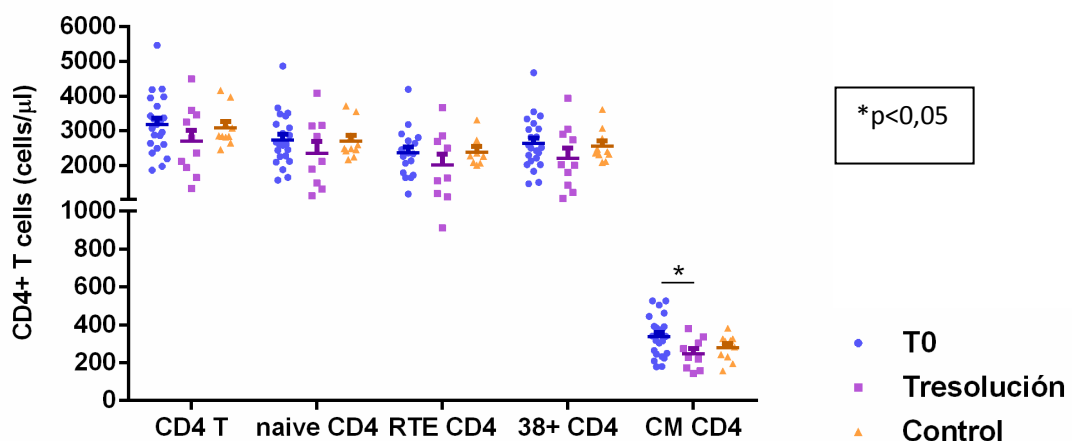
FIGURA 17. Comparación del porcentaje de células TCD4+ según grupos de pacientes

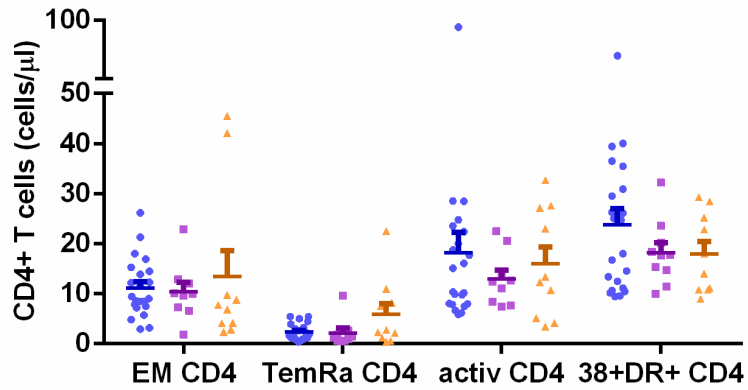




En la figura 18 se muestra un aumento significativo en el nº de células CM CD4 en la fase aguda de la proctocolitis (T0) con respecto a los controles. Estas células son una subpoblación de células T CD4 “Memoria Central” (CM) que implican una activación del sistema inmune reciente ya que se han generado células memoria. En la fase de resolución (Tres) se observa una disminución hasta valores similares a los controles.

FIGURA 18. Comparación del nº absoluto de células TCD4+ según grupos de pacientes.

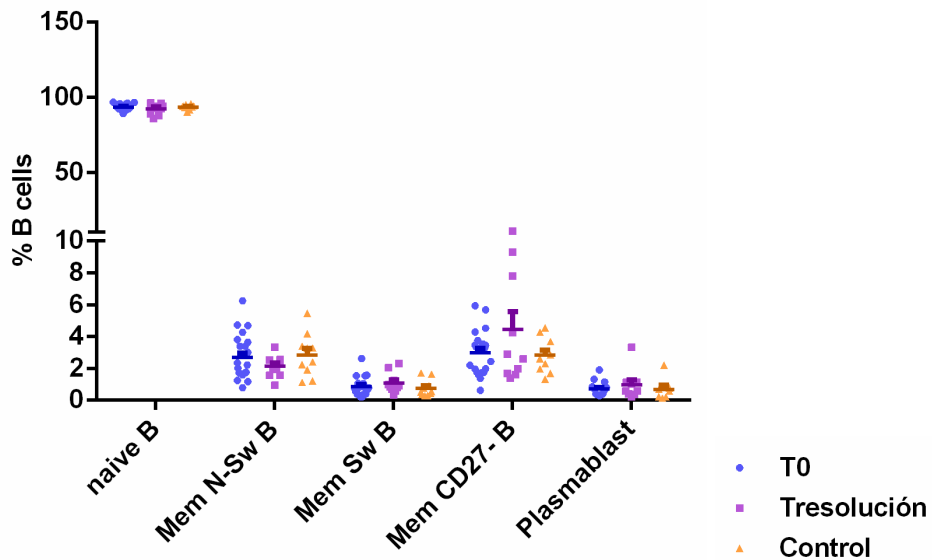




5.2.3. ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS B

Las células B son las encargadas de la producción de anticuerpos IgE en los procesos alérgicos. En los casos de proctocolitis alérgica no se observan diferencias significativas entre las poblaciones de células B naïve y memoria (Figura 19).

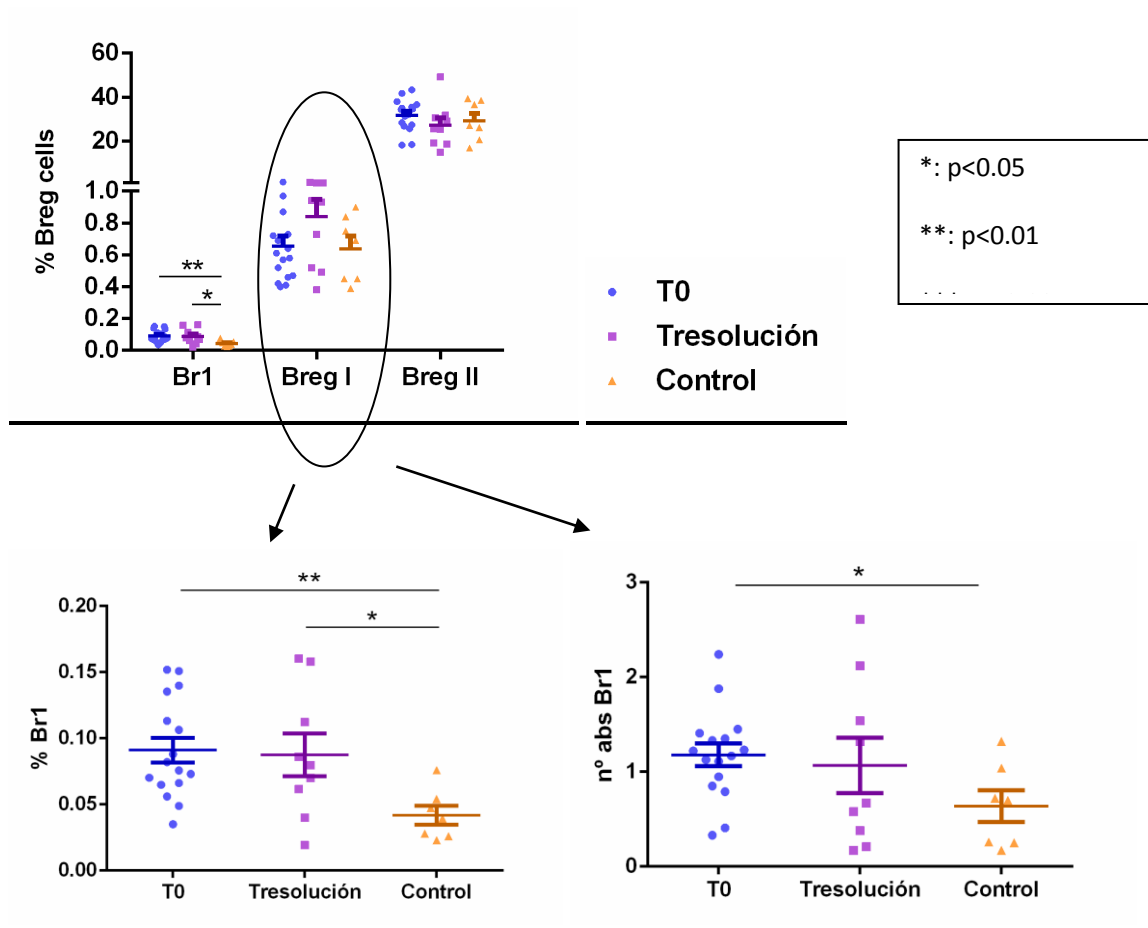
FIGURA 19. Comparación del porcentaje de células B según grupos de pacientes.



Sin embargo, al analizar la subpoblación de células B reguladoras (BR) implicadas en el control o supresión de estas células B (células antiinflamatorias)

se observa que las células BR1 están más elevadas de forma significativa en T0 y Tres comparado con controles sanos (Figura 20).

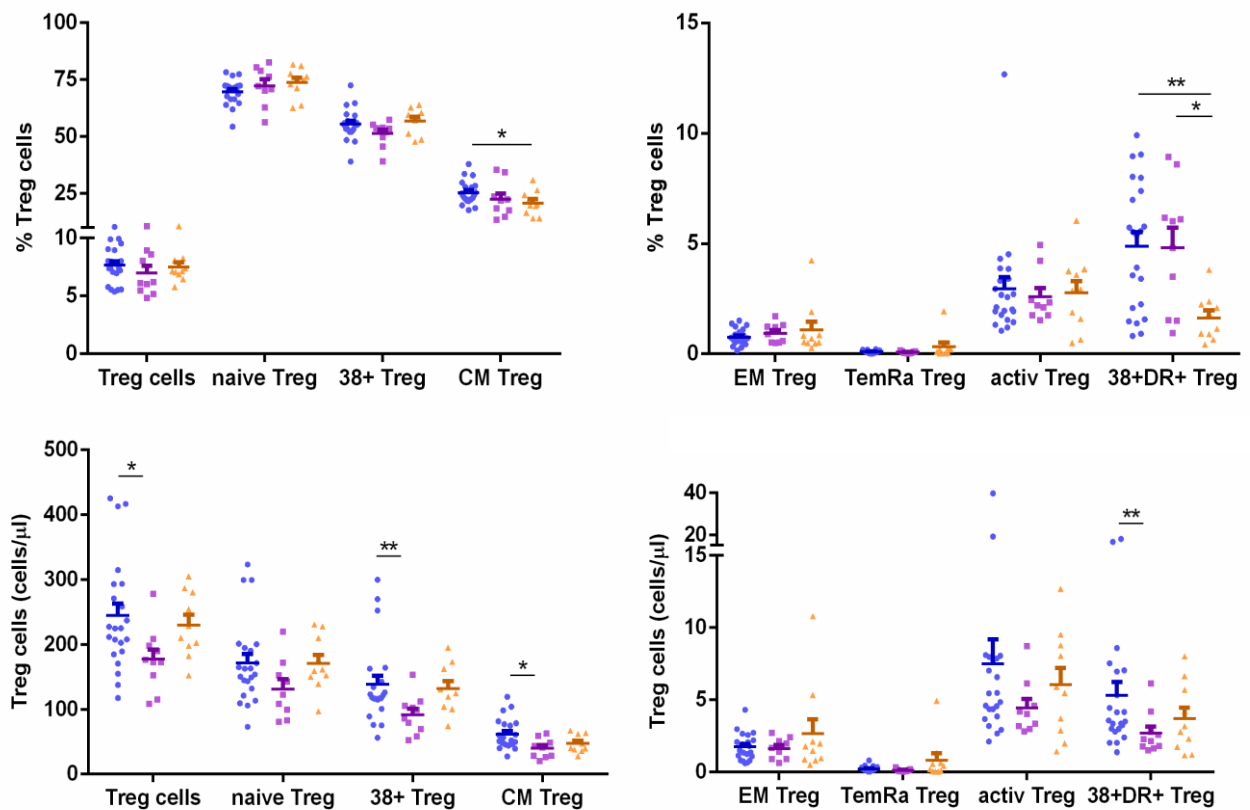
FIGURA 20. Comparación de células B reguladoras según grupos de pacientes.



5.2.4. ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS

Al analizar las subpoblaciones de células T reguladoras (Treg) en los distintos tiempos, se observa que en T0 las Treg están más elevadas con respecto a los controles y posteriormente en T resolución disminuyen cuando se controla la clínica inflamatoria (Figura 21).

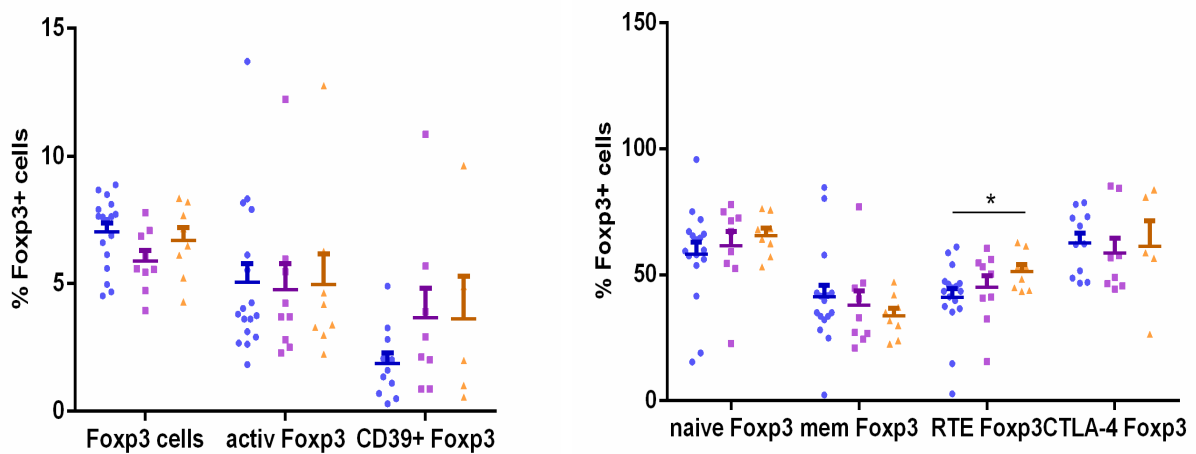
FIGURA 21. Gráfico de células T-reguladoras según grupos de pacientes



Células T-reguladoras efectoras (Foxp3+)

Estos resultados se confirman al analizar las células Treg mediante el marcador intracelular que las define (Foxp3). Se observa que las Treg están más elevadas en T0 comparado con controles lo cual indica que hay un buen control de la respuesta inflamatoria (Figura 22).

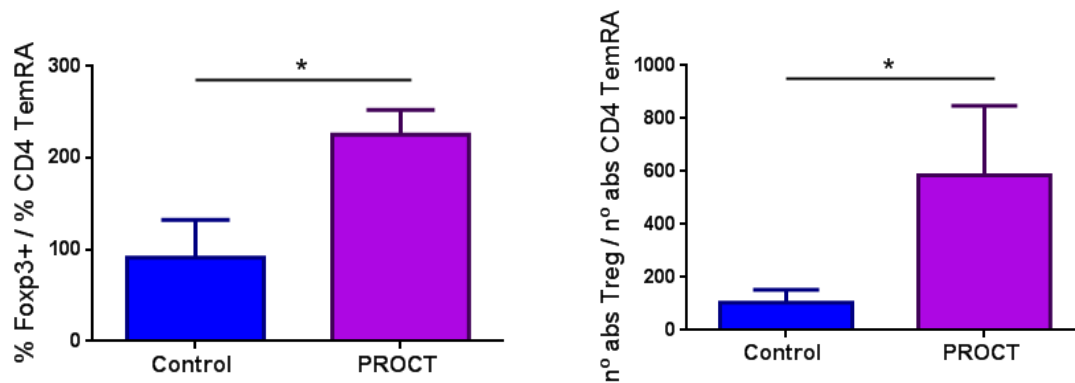
FIGURA 22. Gráfico de células Treguladoras (Foxp3+) según grupos de pacientes.

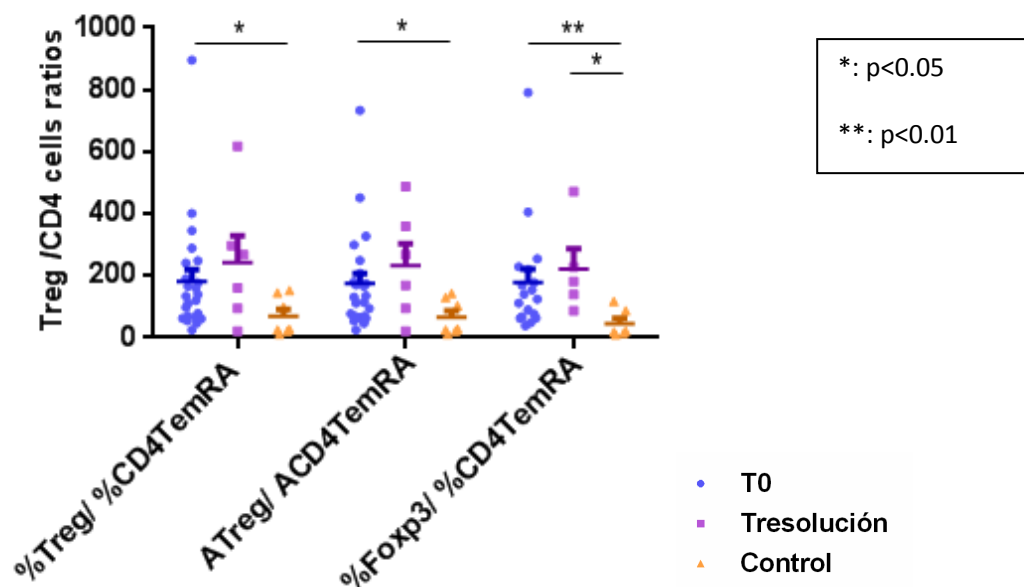


Ratio Treg (Foxp3)/TCD4+TemRA:

Se analizó la relación entre células Treg y las células TCD4+TemRA. Esta relación evalúa la capacidad de las células T reguladoras (Treg) en controlar la activación del sistema inmunológico implicado tras las reacciones antígeno-anticuerpo en el que se eleva las células TCD4+TemRA. Tras el estudio comparativo, se observa que en niños con proctocolitis alérgica, la relación Treg/TCD4+TemRA está elevada respecto a los niños sanos, tanto en porcentaje como en número absoluto (Figura 23).

FIGURA 23. Relación entre células Treg y TCD4+ TemRA según grupos de estudio.





5.2.5. ANÁLISIS DE POBLACIONES MIELOIDES

Se analizó las principales poblaciones mieloides implicadas en la respuesta innata: granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), células NK y monocitos en 16 pacientes con proctocolitis en T0, 9 casos en T resolución y 7 controles (Tablas 12 y 13). Solo se pudo analizar estos resultados en un grupo pequeño de pacientes por la limitación de cantidad de sangre priorizándose ésta para el análisis de poblaciones linfocitarias.

Tabla 12. Comparación del porcentaje de poblaciones mieloides en casos de proctocolitis en distintos tiempos (T0 o T resolución) frente a controles.

POBLACIONES MIELOIDES(%)	CASOS T0 (n=16)	CASOS T RES (n=9)	CONTROLES (n=7)	<i>p</i>
Granulocitos	26,92±10,67	25,57±8,84	17,8±4,6	0,03*
Basófilos	0,80±0,41	0,87±0,33	0,85±0,33	0,646
Basófilos activados	36,13±16,73	38,67±21,14	30,43±12,37	0,562
Basófilos IgE	13,37±16,5	9,59±8,9	13,3±20	0,743
Neutrófilos	66,70±19,44	71,42±28,82	74,71±7,51	0,013*

POBLACIONES MIELOIDES(%)	CASOS T0 (n=16)	CASOS T RES (n=9)	CONTROLES (n=7)	p
Eosinófilos	30,22±18,55	26,6±28,87	21,94±6,41	0,009*
Dendríticas	2,03±0,78	1,65±0,47	2,03±0,71	0,891
-mDC2	6,28±8,2	4,7±6,66	0,7±0,91	0,011*
-mDC1	16,90±7,99	18,8±5,44	18,9±6,11	0,237
-mieloides	75,67±11	73,1±6,4	75,38±8,68	0,680
-plasmocitoides	45,89±19,7	42,85±26,09	48,15±19	0,731
Células NK total	21,38±11,26	21,69±13,42	18,73±5,1	0,914
NK16+56++	12,56±7,86	9,94±4,2	13,03±5,07	0,494
NK16+56+	58,68±12,1	67,7±19,2	77,25±6,1	0,001*
NK16+56-	24,8±8,3	18,68±12,4	8,67±6,7	0,001*
Monocitos	7,4±2,4	6,83±2,68	6,05±1,16	0,261
Monocitos clásicos	87,26±5,53	86,77±8,4	90,68±2,47	0,203

(* Significación estadística)

Tabla 13. Comparación de nº absoluto de poblaciones mieloides en casos de proctocolitis en distintos tiempos (T0 o Tresolución) frente a controles.

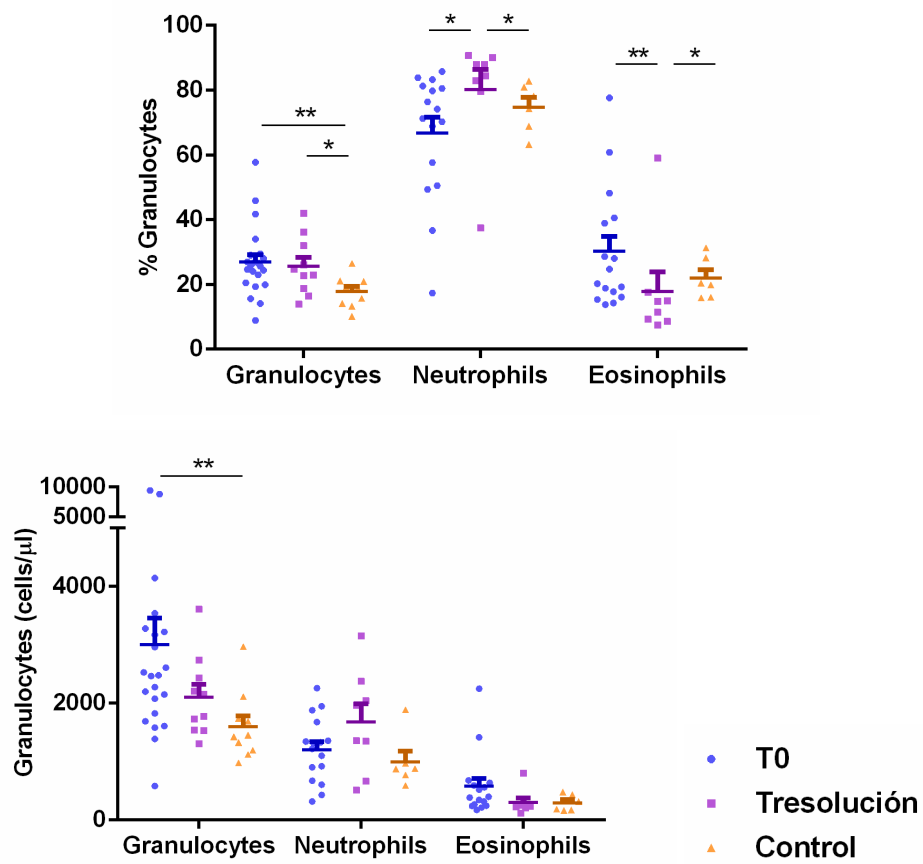
POBLACIONES MIELOIDES(nº abs, cél/µl)	CASOS T0 (n=16)	CASOS T RES (n=9)	CONTROLES (n=7)	p
Granulocitos	3005±2146	2103±693	1602±584	0,003*
Basófilos	80,39±42,56	75,63±38,10	74,84±30,30	0,984
Basófilos activados	30,99±23,98	32,69±29,78	24,43±14,71	0,704
Basófilos IgE	10,02±11,4	8,5±11,6	8,07±10,4	0,675
Neutrófilos	1206±555	1678±885	997±454	0,120
Eosinófilos	576±536	302±209	292±140	0,06

POBLACIONES MIELOIDES(nº abs, cél/ μ l)	CASOS T0 (n=16)	CASOS T RES (n=9)	CONTROLES (n=7)	p
Dendríticas	138 \pm 50	137 \pm 42	184 \pm 93	0,630
-mDC2	7,16\pm8,07	6,13\pm9,77	0,83\pm0,88	0,014*
-mDC1	20,88 \pm 5,6	17,9 \pm 4,44	23,66 \pm 7,9	0,490
-mieloides	141,5 \pm 51,6	101,7 \pm 35,56	142,3 \pm 87,6	0,490
-Plasmocitoides	11,18 \pm 5,27	8,29 \pm 8	8,65 \pm 8,56	0,091
Celulas NK	486 \pm 190	457 \pm 188	457 \pm 103	0,747
NK16+56++	52,4 \pm 23,3	40,27 \pm 9,7	56,75 \pm 14,3	0,494
NK16+56+	294,05 \pm 134	311 \pm 161	354,6 \pm 93	0,261
NK16+56-	116,22\pm53	91,3\pm74	40,9\pm32	0,002*
Monocitos	688 \pm 284	578 \pm 187	511 \pm 171	0,098
Monocitos clásicos	600,4 \pm 248	498 \pm 157	463 \pm 148	0,154

(* Significación estadística)

Se observa que en pacientes con proctocolitis, tanto en T0 como en Tres existe más porcentaje y nº absoluto de granulocitos a expensas de un mayor porcentaje de eosinófilos ($p < 0.05$) y menor % de neutrófilos ($p < 0.05$) comparado con los controles. Además, se observa en la figura 24 como estos valores disminuyen en los pacientes con resolución de la clínica (Tres) de forma estadísticamente significativa.

FIGURA 24. Gráfico de poblaciones mieloides: granulocitos, neutrófilos y eosinófilos según grupos de estudio.

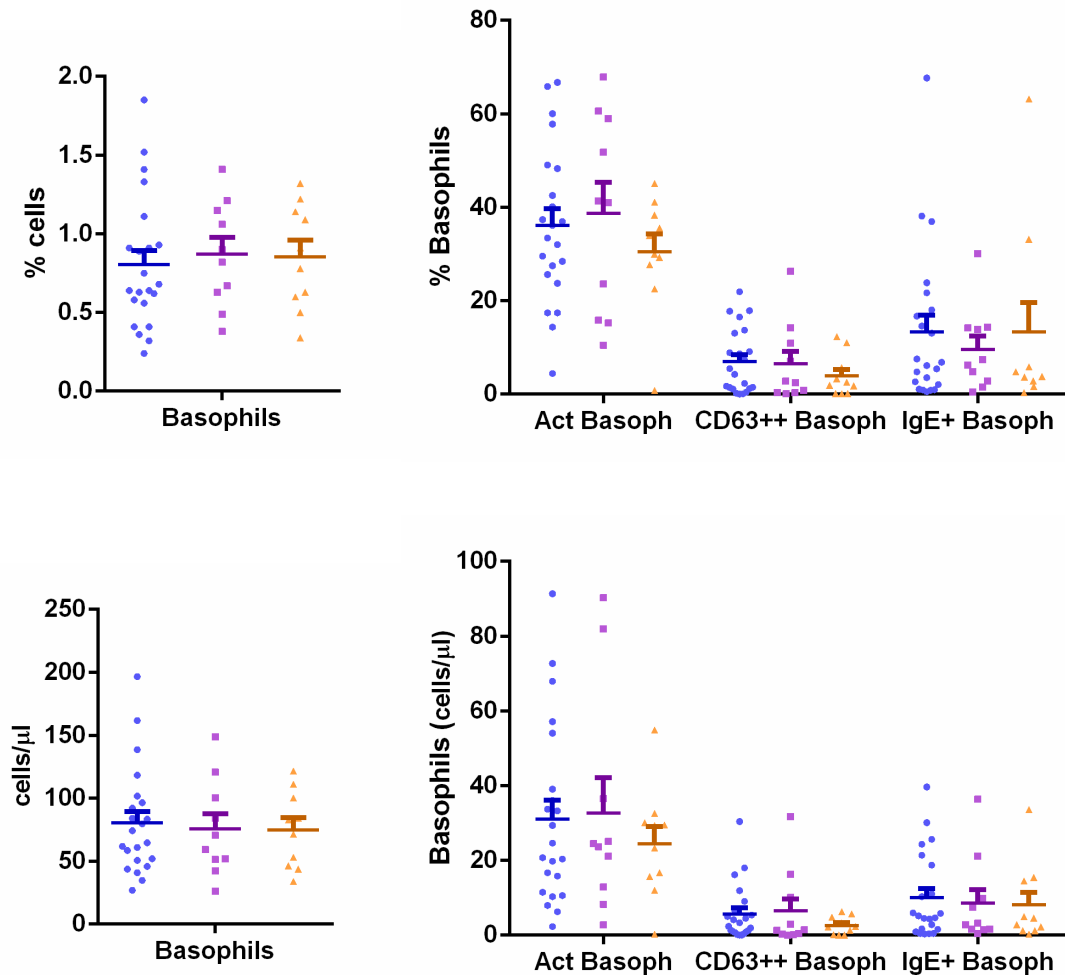


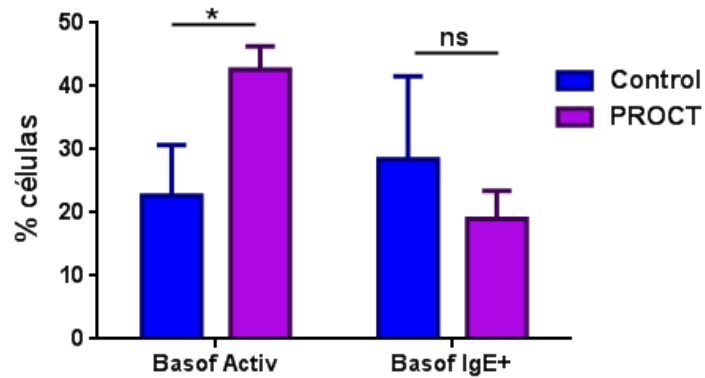
5.2.5.1. Análisis de la población de basófilos

Tal y como se comenta en la introducción, los basófilos son células del sistema inmunológico implicados en la inmunidad innata.

En los pacientes con proctocolitis alérgica se observa un aumento de los basófilos activados frente a los controles sanos con diferencias estadísticamente significativas cuando se agrupan todos los casos de proctocolitis (T0 y Tres). No se observan diferencias significativas en los basófilos IgE+ (activados tras un proceso inmunológico IgE mediado) dado que la proctocolitis alérgica no parece mediada por IgE (Figura 25).

FIGURA 25. Análisis de la población de basófilos en los distintos grupos de pacientes.



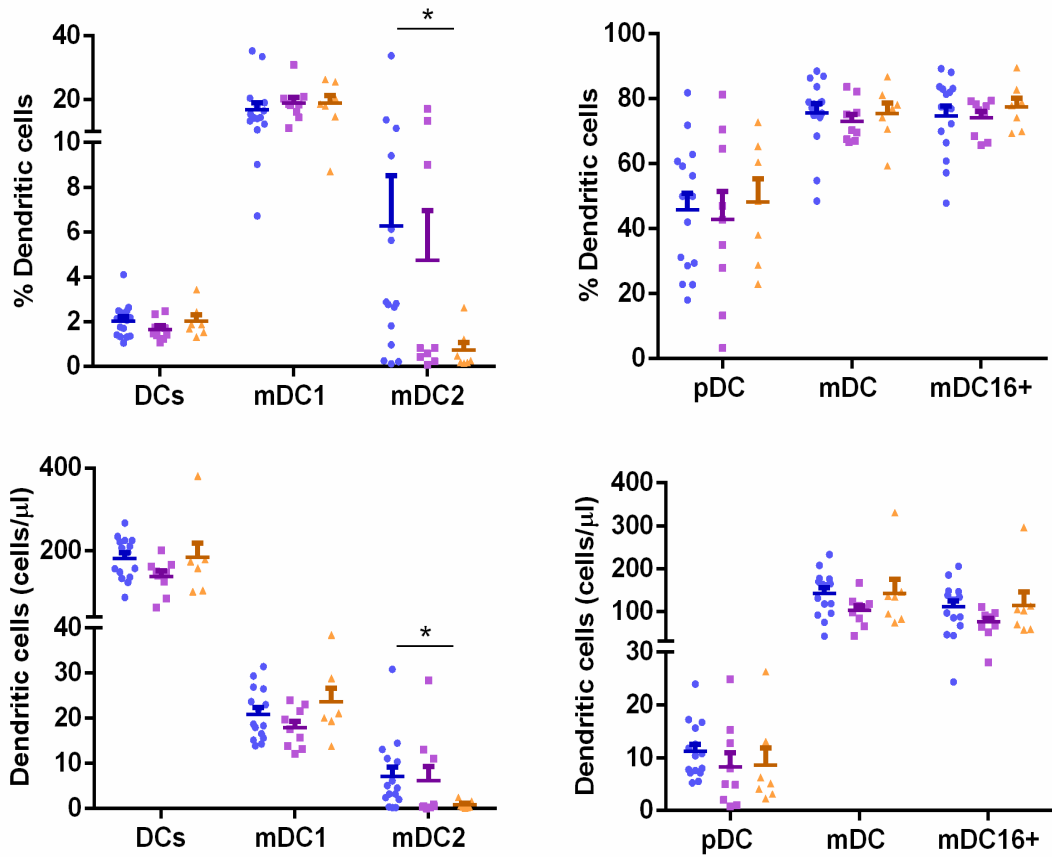


5.2.5.2. Análisis de las células dendríticas

Dentro del subgrupo de células mieloides se analizaron las células dendríticas que son células presentadoras de antígeno que fagocitan patógenos y presentan el material antigénico a las células B y T en la inmunidad adaptativa.

En el estudio se encontró que el porcentaje de células dendríticas (%mDC2) está más aumentado en T0 y T resolución respecto al grupo control ($p=0,05$) (Figura 26). Las células mDC2 son células dendríticas con capacidad de presentación cruzada de antígenos a las células TCD8+, capacidad para secretar IL-12 e IFN γ e inducir una respuesta de tipo Th1 para controlar patógenos intracelulares.

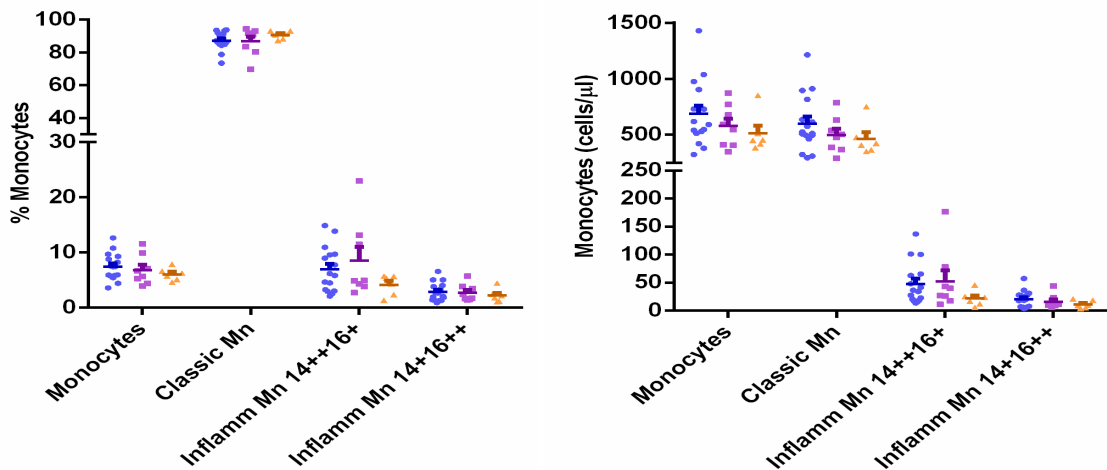
FIGURA 26. Análisis de células dendríticas según grupos de estudio.



5.2.5.3. Análisis de monocitos

No se encontraron diferencias significativas en monocitos entre los casos y controles ni en porcentaje ni n° absoluto:

FIGURA 27. Análisis de monocitos según grupos de estudio.



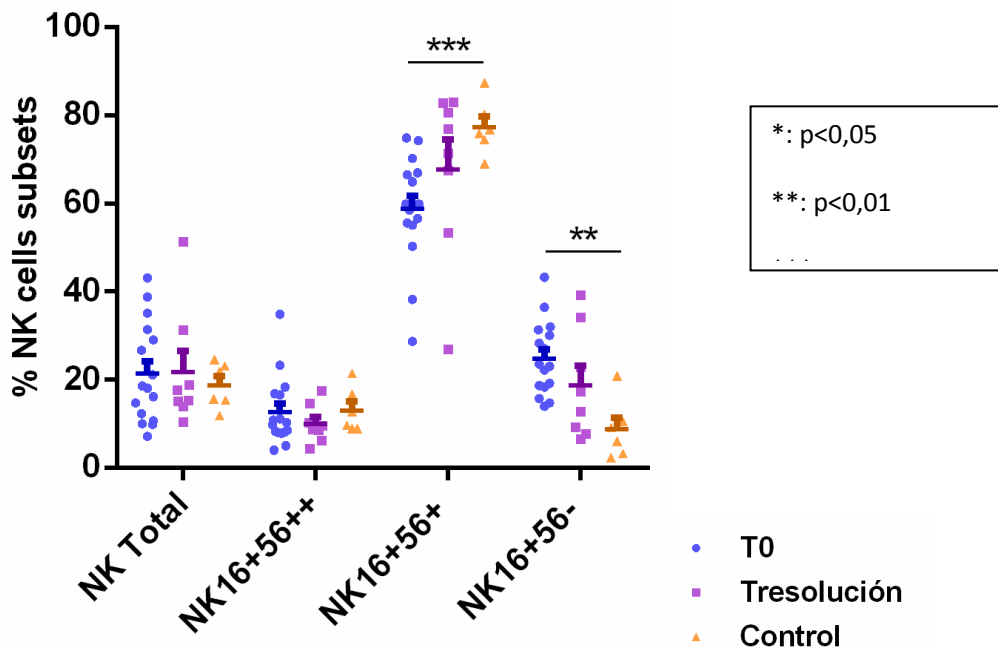
5.2.5.4. Análisis de las células NK (%)

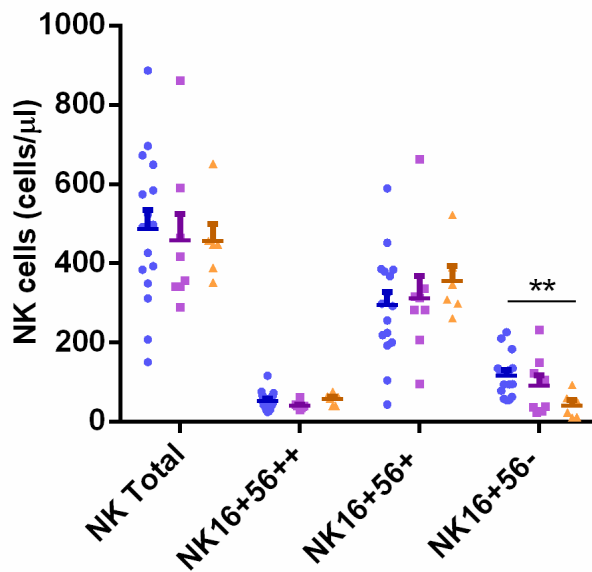
Las células NK implican una activación de la respuesta inmunológica innata. Dentro de ellas se distinguen distintas subpoblaciones celulares:

1. NK16+56++ que son productoras de citoquinas proinflamatorias
2. NK16+56+ con mayor capacidad citotóxica y también productoras de citoquinas.
3. NK16+56- con menor capacidad citotóxica y menor habilidad para la producción de citoquinas. Este subgrupo celular constituye una subpoblación de células NK menos funcional. Estudios previos lo han relacionado con infecciones virales crónicas.

En la figura 28 se muestra como las células NK16+56- se muestran más elevadas en los casos de proctocolitis (tanto en T0 como en T3resolución) frente a los controles de forma significativa ($p < 0,001$).

FIGURA 28. Análisis de células NK según grupos de estudio





5.2.6. ANÁLISIS DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE CITOQUINAS

Se analizaron las células T CD4+ productoras de las citoquinas más importantes involucradas en las respuestas inmunológicas sólo en 12 casos de proctocolitis en T0, 4 casos en T resolución y en 6 controles. No hubo muestra suficiente de sangre para analizar las citoquinas en el resto de pacientes del estudio. Estas citoquinas son las siguientes:

- **IL4** de la respuesta Th2
- **IFN-gamma** de la respuesta Th1
- **IL-17** de la respuesta Th17.

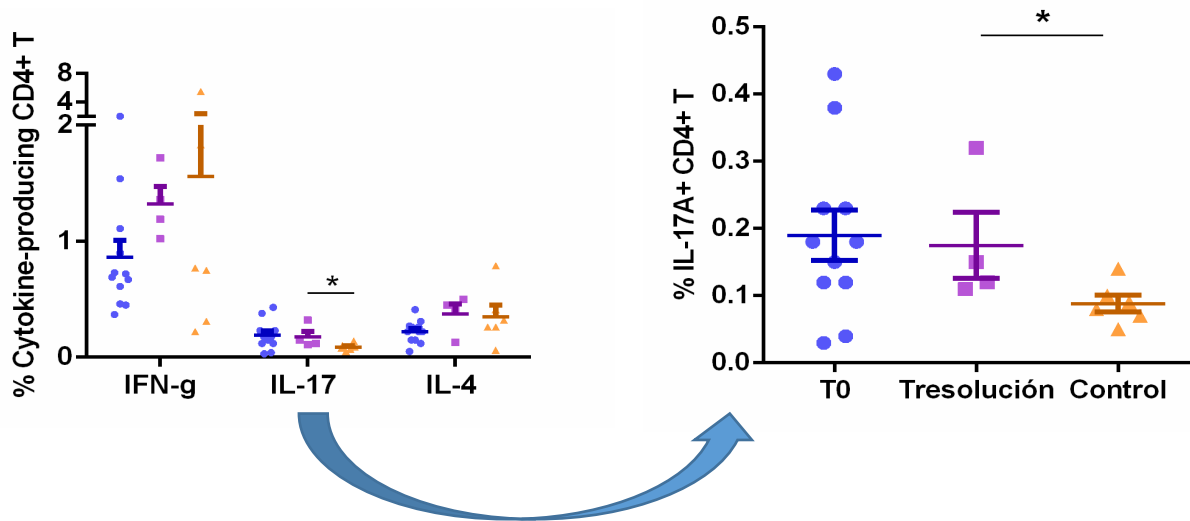
Tabla 14. Comparación de valores de citoquinas en casos de proctocolitis en distintos tiempos (T0 o T resolución) frente a controles.

CÉLULAS T CD4+ PRODUCTORAS DE CITOQUINAS	CASOS T0 (n=12)	CASOS T RES (n=4)	CONTROLES (n=6)	<i>p</i>
IL-4	0,37±0,21	0,42±0,15	0,45±0,28	0,616
IFN-gamma	0,88±0,49	1,3±0,33	1,56±2,0	0,058
IL-17	0,18±0,12	0,19±0,09	0,08±0,28	0,019*

(*Estadísticamente significativo)

En el estudio comparativo de casos de proctocolitis frente a controles sanos se observa que los pacientes con proctocolitis presentan una elevación de las células productoras de citoquina IL17 ($p < 0.05$). Se observan diferencias no significativas en los pacientes con proctocolitis con menor nivel de IFN γ (propia de la respuesta Th1) y menor nivel de IL4 típica de la respuesta Th2 de las alergias IgE mediadas respecto a controles.

FIGURA 29. Análisis de células productoras de citoquinas.



5.3. ESTUDIO DE CORRELACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS

Se realizó un estudio de correlación para intentar definir la posible implicación de las células T reguladoras sobre las poblaciones celulares que muestran diferencias significativas en los pacientes con proctocolitis alérgica con el objetivo de definir mejor el papel de las células T reguladoras en esta entidad.

El estudio de correlación de Pearson muestra como a mayor número de células T reguladoras, mayor nº de células CM CD4 (memoria central) en T0 con un coeficiente de correlación de 0,59 ($p = 0,004$). Además, se observa que la correlación positiva entre los recuentos de Treg y de granulocitos que existe en los pacientes del grupo control ($p = 0,046$) desaparece en los pacientes con proctocolitis.

Tabla 15. Correlación de las células T reguladoras con el resto de poblaciones celulares.

		T0		T Resolución		Control	
		Correlación	p	Correlación	p	Correlación	p
Treg cell/ μ l	% CM CD4+ T cells	-0,069	0,761	-0,251	0,515	0,196	0,587
	CM CD4+ cell/ μ l	0,593**	0,004	0,488	0,183	0,622	0,055
	% EM CD4+ T cells	-0,163	0,467	-0,501	0,169	0,450	0,192
	EM CD4+ cell/ μ l	0,241	0,280	-0,001	0,997	0,489	0,152
	% TemRa CD4+ T cells	-0,221	0,323	-0,201	0,605	0,176	0,626
	TemRa CD4+ cell/ μ l	0,128	0,571	0,015	0,969	0,242	0,501
	% Act CD4+ T cells	0,109	0,629	-0,526	0,146	-0,118	0,746
	Act CD4+ cell/ μ l	0,288	0,193	-0,234	0,544	0,053	0,885
	% IL-17 CD4+ T cells	0,249	0,461	-0,343	0,657	0,192	0,716
	% Br1	0,245	0,360	0,437	0,240	-0,007	0,988
	Br1 cell/ μ l	0,232	0,387	0,691*	0,039	0,134	0,775
	% NK16+56+	-0,354	0,178	-0,012	0,977	0,378	0,356
	NK16+56+ cell/ μ l	-0,150	0,579	0,266	0,525	0,169	0,749
	% NK16+56-	0,344	0,192	0,149	0,724	-0,186	0,724
	NK16+56- cell/ μ l	0,345	0,191	0,201	0,632	-0,167	0,752
	% Granulocitos	-0,162	0,470	-0,265	0,460	0,613	0,060
Granulocitos cell/ μ l	-0,039	0,865	0,407	0,243	0,640*	0,046	
% Neutrofilos	-0,008	0,975	0,139	0,743	-0,108	0,838	

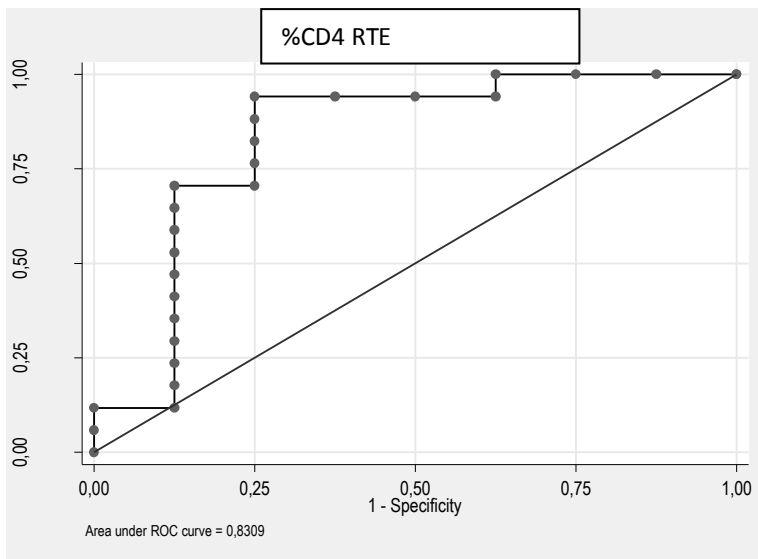
	Neutrofilos cell/μl	-0,027	0,921	0,201	0,634	0,837*	0,038
	% Eosinófilos	-0,001	0,997	-0,132	0,756	0,123	0,816
	Eosinófilos cell/μl	-0,169	0,532	-0,042	0,921	0,791	0,61
	% mDC2	-0,112	0,691	0,386	0,304	-0,298	0,516
	mDC2 cell/μl	-0,200	0,474	0,240	0,534	-0,367	0,418

5.4. CURVAS ROC DE LOS MARCADORES INMUNOLÓGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE PROCTOCOLITIS

Dado que en los pacientes con proctocolitis se han encontrado mayor porcentaje o n° de células CM CD4, BR1, CM Treg, 38+DR+Treg, granulocitos, eosinófilos, células dendríticas mDC2, células NK 16+56- y células productoras de IL-17 que en los controles sanos; se ha construido una curva ROC para cada uno de estos marcadores inmunológicos e identificar su utilidad como marcador diagnóstico.

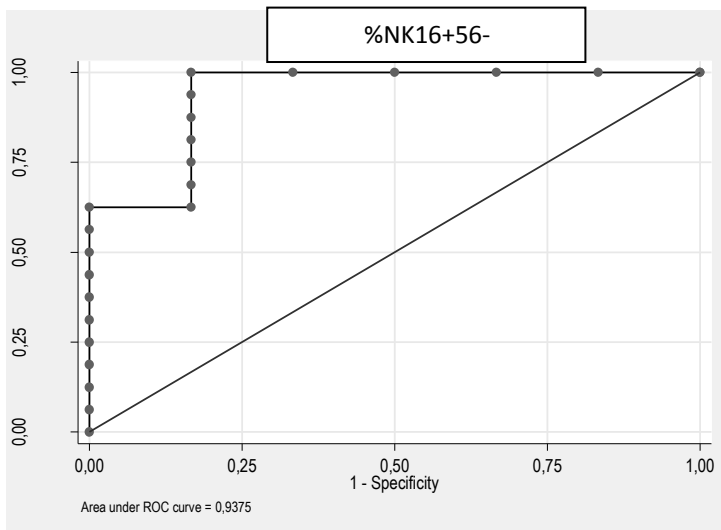
A continuación, se muestran las curvas ROC de los marcadores inmunológicos que mejor discriminan los casos frente a los controles, es decir, los que muestran un área bajo la curva mayor con significación estadística (Figuras 30-34).

FIGURA 30. Curva ROC del porcentaje de células CD4 RTE



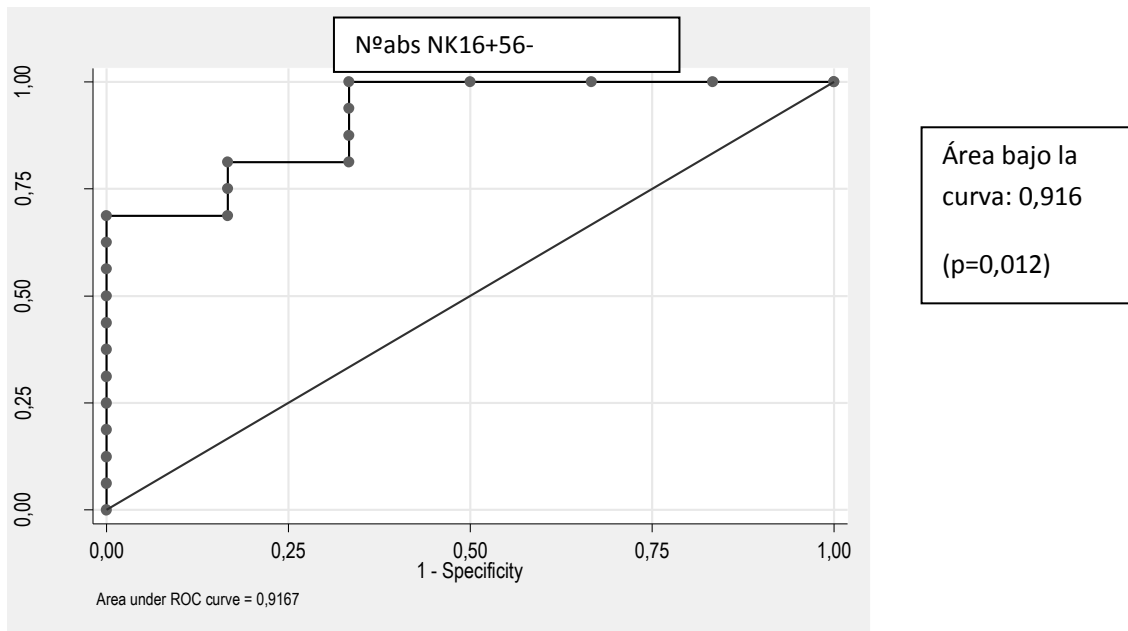
Área bajo la
curva: 0,83
($p=0,01$)

FIGURA 31: Curva ROC del porcentaje de células NK16+56-



Área bajo la
curva: 0,93
($p=0,012$)

FIGURA 32. Curva ROC del nº absoluto de células NK16+56-



El punto de corte para el nº de células NK16+56- con la máxima eficiencia sería 54,58 células/ μ L con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 66,7% lo que aportaría un valor predictivo positivo del 88,9% y un valor predictivo negativo del 100%.

FIGURA 33. Curva ROC del porcentaje de granulocitos

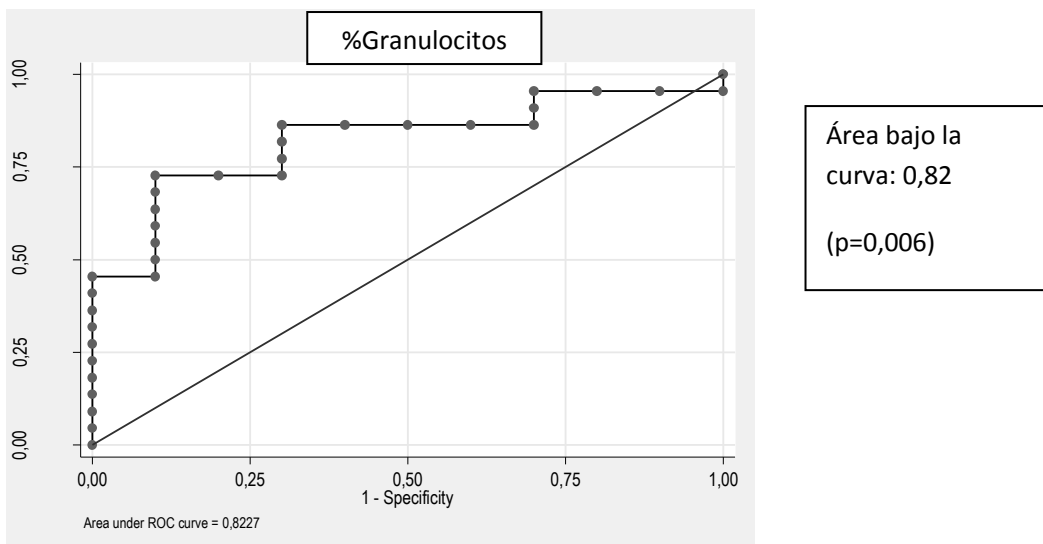
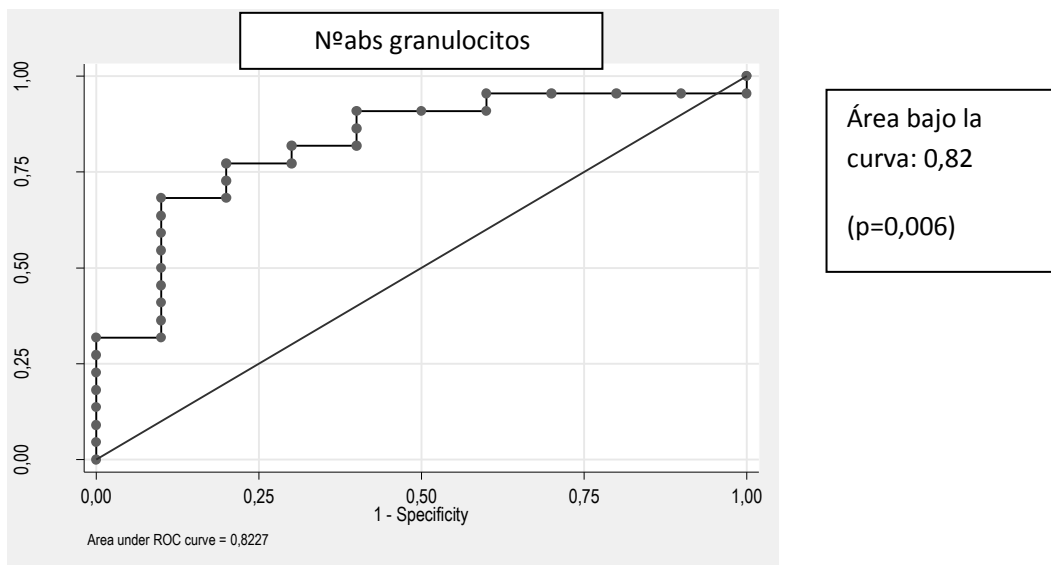


FIGURA 34. Curva ROC del nº absoluto de granulocitos



El punto de corte para el nº de granulocitos con la máxima eficiencia diagnóstica sería 1583 células/ μ L con una sensibilidad del 90,9%, una especificidad del 60% lo que aportaría un valor predictivo positivo del 83,3% y un valor predictivo negativo del 75%.

5.5. CORRELACIÓN CLÍNICO-INMUNOLÓGICA

Se realizó un estudio de correlación de las variables inmunológicas que mostraban diferencias significativas en los casos de proctocolitis frente a los controles sanos con las variables clínicas de los pacientes.

5.3.1. CORRELACIÓN CON EL SCORE CLÍNICO

Se analizó la correlación entre el score clínico y las distintas variables clínicas e inmunológicas de los pacientes con proctocolitis para evaluar si alguna de las características clínicas o parámetro inmunológico podría ser un factor de gravedad de la proctocolitis alérgica.

Los resultados de este análisis muestran como un score clínico más alto al diagnóstico se correlaciona con un mayor porcentaje de basófilos con un coeficiente de correlación de +0.38 ($p=0.032$). No se encontró correlación con el resto de variables clínicas ni inmunológicas (Tabla 16)

Tabla 16. Correlación de variables clínicas e inmunológicas con el score clínico propuesto en la proctocolitis alérgica.

Variables clínicas e inmunológicas	COEFICIENTE CORRELACIÓN	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (p)
Edad de inicio de síntomas	0.086	0.639
Zscore de IMC al diagnóstico	0.014	0.953
Tiempo en resolverse la sintomatología tras inicio del tratamiento	0.099	0.598
T1 o edad de introducción de PLV	-0.189	0.365
IMC de T1	0.134	0.365
T2 o edad de adquisición de tolerancia a PLV	-0.195	0.385
IMC de T2	-0.146	0.509
Células T CD4 (RTE)	0.136	0.509

Variables clínicas e inmunológicas	COEFICIENTE CORRELACIÓN	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (p)
%NK16+56+	0.208	0.330
%NK16+56-	-0.037	0.864
% Br1	-0.153	0.466
%Treg	-0.124	0.497
%Granulocitos	-0.10	0.956
%Eosinófilos	-0.327	0.119
%Neutrófilos	0.385	0.063
% Basófilos	+0.380	0.032*
%Basófilos activados	0.119	0.515
%células dendríticas mDC2	0.078	0.719
%células productoras de IL17	-0.146	0.603

(*: Estadísticamente significativo)

5.3.2. EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES SEGÚN EL TRATAMIENTO RECIBIDO PARA LA PROCTOCOLITIS ALÉRGICA

Se compararon diferentes variables de evolución clínica en función del tratamiento recibido para la proctocolitis alérgica. Para ello se agruparon los pacientes en función del tratamiento recibido. Los distintos grupos de tratamiento fueron:

1. HePLV sin probióticos (con o sin lactancia materna con exclusión)
2. HePLV con probióticos (con o sin lactancia materna con exclusión)
3. Lactancia materna con exclusión de proteínas de leche de vaca.

Los resultados del estudio se exponen en la tabla 17. En este análisis no se observan diferencias significativas en las variables clínicas en función del tratamiento recibido.

Tabla 17. Evolución clínica de los pacientes según el tratamiento recibido.

VARIABLES	HePLV sin PB (n=13)	HePLV con PB (n=8)	LM exclusión (n=10)	(p)
Edad de resolución de la clínica (Tres)	3 (2-5) meses	2.4 (1.7-3) meses	3.25 (2.7-4) meses	0.362
Tiempo de tratamiento hasta la resolución (Tres)	1 (0.6-1.4) meses	1 (0.6-1.3) meses	1 (1-1.5) meses	0.226
Zscore IMC tras la resolución clínica (Tres)	-0.78 (-1.36,+1.4)	-0.4 (-0.96, -0.24)	-0.09(-0.86,+0.55)	0.722
Edad de reintroducción de las PLV (T1)	10 (9-11.5) meses	10.5 (9-12.5) meses	9.5 (8-11.7) meses	0.609
Zscore del IMC tras la reintroducción de las PLV (T1)	-0.31(-1.3, +1.17)	-0.80 (-1.1, -0.24)	-0.62 (-1.29, +1.03)	0.747
Edad de adquisición de tolerancia (T2)	13 (12-15) meses	14.5 (12.75-19.25) meses	14 (14-17) meses	0.292

(Los resultados se muestran en medianas con p25-75).

Se compararon las poblaciones linfocitarias tras la exclusión de PLV de la dieta (recogidas en Tres) según el tipo de tratamiento recibido. Dado que en el análisis por subgrupos de Tres el tamaño muestral era muy pequeño y asimétrico, no se ha podido realizar un estudio comparativo.

5.3.2. EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DEL FENOTIPO INMUNOLÓGICO

Se realizó un estudio de correlación para analizar si la alteración de células inmunológicas de los casos de proctocolitis podrían ser factores predictores de la evolución clínica de los pacientes medida por la edad de introducción de PLV (T1) y la edad de adquisición de la tolerancia (T2).

El % de células NK16+56-, % de células T reguladoras, % y nº absoluto de células dendríticas mDC2 y de células productoras de IL-17 medidas en T0 o T resolución se correlacionan con una mayor edad de introducción de PLV y de

adquisición de tolerancia oral. No se ha encontrado una correlación entre el resto de poblaciones inmunológicas estudiadas (CM CD4, Br1, CM Treg, granulocitos y eosinófilos) con la evolución clínica del paciente. Las poblaciones inmunológicas que muestran diferencias significativas se muestran en la tabla 18 junto con su coeficiente de correlación con las variables de evolución clínica.

Tabla 18. Estudio de correlación de poblaciones inmunológicas con la evolución clínica de casos de proctocolitis.

Población celular	Edad de introducción PLV (T1)		Edad de adquisición de tolerancia (T2)	
	Coeficiente correlación	(<i>p</i>)	Coeficiente correlación	(<i>p</i>)
%NK16+56+	-0.56	0.019*	-0.43	0.12
%NK16+56-	0.53	0.028*	0.489	0.076
%Treg	0.39	0.05*	0.46	0.03*
%mDC2	0.70	0.002*	0.56	0.03*
Nºabs mDC2	0.67	0.003*	0.56	0.038*
IL-17+	0.75	0.003*	0.62	0.024*

(*Estadísticamente significativos. Prueba no paramétrica Rho de Spearman).

5.6. ANÁLISIS DE VALORES DE VITAMINA D

Se analizaron los valores de Vitamina D en 16 casos en fase aguda de la proctocolitis (T0) y en 5 controles. No hubo suficiente muestra de sangre para realizar el análisis en el resto de los pacientes incluidos en el estudio.

Los valores de vitamina D de los pacientes con proctocolitis en T0 y los de los controles sanos no muestran diferencias estadísticamente significativas (Tabla 19).

Tabla 19. Comparación de valores de Vitamina D ($\mu\text{g/L}$) de pacientes con proctocolitis en T0 frente a controles sanos.

	Casos T0 (n=16)	Controles (n=5)	<i>p</i>
Vitamina D ($\mu\text{g/L}$)	18,8 (15,4-24,32)	15,7 (10,2-18,8)	0,208

U de Mann-Whitney. Medianas (p25-75)

5.6.1. CORRELACIÓN DE VALORES DE VITAMINA D CON MARCADORES INMUNOLÓGICOS

Se analizó la correlación de los distintos marcadores inmunológicos con los valores de Vitamina D. Los marcadores que muestran correlación significativa con la Vitamina D son el % de NK16+56+ y el nº absoluto de células B reguladoras BR1. No se encontró correlación con el resto de marcadores, incluidos con los porcentajes y nºabsolutos de células Treg. Estos resultados se exponen en la tabla 20.

Tabla 20. Correlación de marcadores inmunológicos con los valores de Vitamina D

	Coefficiente de correlación	p
% de NK16+56+	-0.503	0.047*
nº absoluto BR1	0.691	0.003*
%Treg	-0,106	0,648
Nºabs Treg	-0,30	0,898

Rho de Spearman.*=estadísticamente significativo.

5.6.2. CORRELACIÓN DE VALORES DE VITAMINA D CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA

Se analizaron los distintos tiempos de evolución (T1 o edad de introducción de proteínas de leche de vaca y T2 o edad de adquisición de tolerancia oral) en función de los valores de vitamina D. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas (tabla 21).

Tabla 21. Correlación entre edad de T1 y T2 con los valores de Vitamina D.

Correlación	Edad de introducción PLV (T1)		Edad de adquisición de tolerancia (T2)	
	Coeficiente correlación	<i>p</i>	Coeficiente correlación	<i>p</i>
Vitamina D	-0.056	0.843	-0.255	0.379

Rho de Spearman



CAPITULO 6: DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La alergia alimentaria supone un problema de salud pública a nivel mundial cuya prevalencia va en aumento estimándose alrededor del 3-8%(3)(18),(102). La proteína de leche de vaca es el principal alérgeno que causa reacciones alérgicas en España(102). La etiopatogenia de la alergia a proteínas de leche de vaca IgE mediada es bien conocida y hay muchos estudios publicados que revelan alteraciones inmunológicas, fundamentalmente en la población de células T reguladoras, que no solo explican la causa de la enfermedad, sino además los objetivos terapéuticos sobre las que se dirigen tratamientos específicos como la inducción a la tolerancia oral. Sin embargo, esta situación es totalmente diferente para la alergia a proteínas de leche de vaca no IgE mediada. En esta entidad se presupone una causa mediada por células T(7), pero se desconoce realmente el mecanismo inmunológico por el que se origina. Esto hace que no existan unos test específicos para el diagnóstico por lo que el médico debe guiarse por la clínica del paciente y la resolución de la sintomatología al retirar las proteínas de leche de vaca de la alimentación.

La principal manifestación clínica de las alergias no IgE mediadas es la sintomatología digestiva que suele ser inespecífica tanto en sus formas graves como en las más leves. La falta de unos marcadores específicos para la alergia no mediada por IgE hace que el diagnóstico de esta entidad sea un reto para el clínico. El médico no sólo debe saber cuándo pensar en una probable alergia no mediada por IgE sino también como diferenciarla de otras posibles causas. Este hecho ha supuesto un aumento progresivo del diagnóstico de alergia no mediada por IgE(103)(104), con consecuencias nutricionales en el paciente (dietas restrictivas, trastornos de conducta alimentaria o aversión a alimentos)(18), consecuencias económicas en la familia y en la sociedad por el consumo de fórmulas hidrolizadas de proteínas de leche de vaca y alteración por tanto de la calidad de vida de los pacientes y sus familias(105).

El subgrupo clínico de alergia a proteína de leche de vaca que se ve más afectado por este posible sobrediagnóstico es el de las formas menores o atípicas. Esto se debe a que la sintomatología es muy similar a los trastornos

funcionales gastrointestinales del lactante cuyo diagnóstico también clínico se basa en los nuevos criterios Roma IV(20). Según una revisión sistemática reciente(106), la prevalencia de estos trastornos funcionales se estima entre el 27 y el 38% de los niños menores de 4 años según los criterios antiguos de Roma II y III. Dentro de ellos, la regurgitación tiene una prevalencia de casi el 26%, los cólicos del 6% según las series y la diarrea del 8-12%. En estos tres trastornos funcionales cuando la sintomatología es más intensa o duradera se admite una prueba de retirada de proteínas de leche de vaca para descartar una alergia no mediada por IgE. Recientemente el estudio CoMiss(24) ha permitido restringir esta prueba diagnóstica a aquellos pacientes con un score clínico más sugestivo de alergia no mediada por IgE. A pesar de ello el diagnóstico sigue siendo fundamentalmente clínico y por tanto susceptible a error y por tanto a un sobrediagnóstico de alergia no mediada por IgE.

El presente trabajo pretende esclarecer los mecanismos inmunológicos de la entidad para encontrar unos marcadores específicos de alergia que nos pueda permitir diagnosticar con más seguridad la alergia no mediada por IgE, correlacionarla con la gravedad clínica y con la evolución del paciente. Esto permitiría poder descartarla de otras patologías (trastornos funcionales), evitaría el sobrediagnóstico de esta entidad y podría abrir líneas de tratamiento y prevención de esta patología. Dentro de las alergias no IgE mediadas, se ha escogido la proctocolitis alérgica para el estudio de células T y otros parámetros inmunológicos puesto que es la entidad que presenta mayor prevalencia, mayor facilidad para el diagnóstico según la clínica, menos gravedad en el paciente y menos confusión con otras causas médicas. Los resultados de este estudio de tesis doctoral podrían corroborarse posteriormente en otras alergias no IgE mediadas más graves (enterocolitis o enteropatía) o más inespecíficas (formas menores) para definir mejor el diagnóstico, pronóstico y crear nuevas líneas terapéuticas para esta entidad.

6.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS CASOS DE PROCTOCOLITIS

La proctocolitis alérgica o FPIAP es la forma más común y benigna de alergia a proteínas de leche de vaca no-IgE mediada lo que supone el 16-64% de las causas de sangrado rectal en el lactante. En este estudio se ha reclutado 32

pacientes con proctocolitis alérgica a lo largo de 3 años. La prevalencia de proctocolitis según los estudios epidemiológicos(107),(26) es mayor que la incidencia de casos recogidos a lo largo de 3 años. Esto probablemente se deba a un cambio en el manejo de estos pacientes, diagnosticados y tratados más por pediatras de atención primaria en vez de especialistas en digestivo infantil hospitalarios gracias a las guías de práctica clínica del 2015(6). Esto hace que se derive al especialista los casos con sintomatología más florida o prolongada que coincide con el fenotipo clínico de los pacientes reclutados en este estudio. Sin embargo, en ningún caso fue necesario la realización de rectoscopia para confirmar la sintomatología o el cambio de tratamiento a fórmula elemental por la persistencia de los síntomas.

Cuando comparamos las características clínicas de los pacientes de otros estudios clínicos, como el de Nowak et al(14) y estudio de Kaya(108), se observa que los pacientes de nuestro estudio presentan características similares a esas poblaciones de estudio(Tabla 22). Nuestra muestra, por tanto, presenta resultados concordantes con lo publicado previamente, y por tanto los hallazgos pueden ser extrapolables a otras muestras más amplias.

Tabla 22. Comparación de características clínicas de los pacientes del estudio con las referidas la publicación de Nowak et al(14).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	PACIENTES DEL ESTUDIO	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA(14)
Edad de inicio de síntomas	1.66+/- 1.45 meses	1.7±1.32
Alimentación previa del paciente	65.5% lactancia materna 9.4% lactancia artificial 25% lactancia mixta	60% lactancia materna
Antecedentes de atopia		
- Personales	6.7% dermatitis atópica	20%
- Familiares	41.9%	25%

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	PACIENTES DEL ESTUDIO	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA(14)
Síntomas		
Rectorragia	100%	70%
Vómitos	15.6%	18.3
Diarrea	25%	5%
Edema	0%	Infrecuente
Shock	0%	No
Fallo de medro	15.6% escasa ganancia	no
Pruebas de laboratorio		
Anemia	37%	Infrecuente
Hipoalbuminemia	0%	Infrecuente
Prueba alérgica:		
IgE total	0.15±0.62 KU/L	29.9±56
InmunoCAP	negativas	Negativo
Biopsia intestinal	No realizada en ningún paciente del estudio	No necesaria para el diagnóstico: infiltrado de eosinófilos en abscesos crípticos
Prueba de provocación	No realizada en ningún caso	No necesaria para el diagnóstico
Tipo de tratamiento	34.4% dieta materna Resto hidrolizado. Ninguno precisa F. elemental	Dieta materna o HePLV 10% necesitan F. elemental
Reintroducción de PLV	10.3+/-2 meses para reintroducir 14.6+/-3.34 meses para adquisición de tolerancia	12 meses para la reintroducción. 13 meses para la adquisición de tolerancia

Además de la sintomatología frecuentemente descrita en la proctocolitis aguda, en nuestro estudio se evidencia que hasta el 37.5% de los pacientes asociaban irritabilidad y un 9.3% rechazo de la alimentación que se resolvió tras la retirada de PLV en la dieta.

La proctocolitis alérgica por lo general no produce alteración en el desarrollo ponderoestatural. Sin embargo, el 9% de los pacientes de nuestra muestra tenían parámetros nutricionales con fallo de medro lo cual podría estar influenciado por otros factores como el peso al nacimiento. Esto define una muestra del estudio con parámetros antropométricos más alterados que los descritos en la literatura(14). Llama la atención que el 15.6% referían menor ganancia ponderal en el momento de la sintomatología. Tras el tratamiento con dieta de exclusión, los pacientes muestran mejorías en sus valores de IMC de forma significativa. En la revisión de Kaya de 60 casos de proctocolitis, un 10% de los pacientes mostraban una alteración del crecimiento como en nuestro estudio(108). Sería necesario un estudio con mayor tamaño muestral para confirmar esta alteración de la ganancia ponderal.

Cabe destacar que, en los pacientes en los que se realizó hemograma, más de la mitad presentaban leucocitosis con monocitosis y un 40% eosinofilia en sangre periférica. Estos hallazgos son inespecíficos pero su prevalencia es mayor que la publicada en estudios previos(26),(109),(110), teniendo en cuenta el tamaño de la muestra estudiada. En la revisión de Kaya et al(108), solo en el 6% presentaban eosinofilia en sangre periférica. Esta eosinofilia probablemente esté en relación con un mayor porcentaje de antecedentes personales y familiares de atopia.

En lo que se refiere a la sintomatología de nuestros pacientes, tarda más tiempo en resolverse clínicamente (mediana de 1 mes) comparado con el tiempo referido en revisión previas (48-96 horas). Este hecho puede deberse a que son pacientes con sintomatología más prolongada o persistente, como se ha descrito hasta en un 12% de los casos en la literatura(107),(98),(26); motivo por el que han sido derivados desde atención primaria a consultas de Digestivo infantil. Los estudios previos referidos no hacen relación al tiempo de evolución de los síntomas hasta el diagnóstico por el especialista.

Cabe destacar que tres de los pacientes inicialmente incluidos en el estudio desarrollaron, durante el seguimiento posterior, alergia mediada por IgE. Este fenómeno se ha descrito previamente de forma más frecuente en pacientes con

FPIES(51). Caubet et al(111), describen en una revisión de FPIES de más de 10 años, que hasta el 24% de la muestra de 160 pacientes con FPIES tenían una IgE específica positiva a algún alimento y que de ellos hasta el 41%, durante su evolución, cambiaban su fenotipo clínico pasando de una sintomatología de enterocolitis a manifestaciones IgE mediadas como la urticaria, siendo este porcentaje mayor que el de nuestra muestra. Estos pacientes fueron excluidos en el análisis final.

Las características clínicas de los pacientes del estudio, diagnosticados de proctocolitis y los casos control, no muestran diferencias significativas lo cual nos permite hacer una comparación de las variables inmunológicas entre ambos grupos. Los pacientes recogidos en el momento agudo de la enfermedad y los recogidos tras la resolución clínica muestran características clínicas similares de edad, sexo, score clínico al diagnóstico, antecedentes personales y familiares, estado nutricional, tipo de tratamiento y evolución clínica. Por tanto, también son pacientes comparables, no encontrando ningún factor de confusión para la valoración de los marcadores inmunológicos antes y después de la instauración del tratamiento.

6.2. INTERPRETACION DE HALLAZGOS INMUNOFENOTÍPICOS DE LA PROCTOCOLITIS ALÉRGICA

A continuación, se interpretarán los hallazgos inmunológicos observados en los pacientes con proctocolitis alérgica frente a los controles sanos que definen el fenotipo inmunológico de esta entidad.

6.2.1. ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS TOTALES (INMUNIDAD ADQUIRIDA)

En el estudio no se observan diferencias significativas en los valores globales de las diferentes poblaciones linfocitarias (células B, T) entre los casos de proctocolitis alérgica con respecto a los controles sanos. De ello se deduce que en la proctocolitis alérgica no se ha encontrado un mecanismo fisiopatológico que dependa de la inmunidad adaptativa, como se demostró posteriormente con el análisis de las subpoblaciones linfocitarias que se expone a continuación.

6.2.2. ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS T CD4+

En los casos de proctocolitis alérgica, no se ha encontrado diferencias en la mayoría de las poblaciones de células T-CD4. Sin embargo, sí se encuentra una disminución de la población de células T CD4+ RTE de nuestros casos respecto a los controles. Como se comentó anteriormente, las RTE son células recién emigradas del timo que representan un marcador de producción tímica de células T. Esta población además refleja una diferenciación activa de estas RTE hacia células maduras o diferenciadas. La disminución de RTE en el grupo de proctocolitis probablemente se deba a que en el desarrollo de esta entidad se produce una activación y diferenciación de las células T CD4 recién salidas del timo, debido al proceso inflamatorio que ocurre en la proctocolitis, y por tanto disminuyen las células nuevas RTE recién producidas en el timo, que se están diferenciando para participar en dicha inflamación.

Por otro lado, el aumento del número de células T CM CD4 o “central memory”, que se observa en nuestra muestra de casos, traduce una activación reciente del sistema inmunológico en el momento agudo de la proctocolitis alérgica. Estas células muestran valores similares a los controles sanos en la fase de resolución de la proctocolitis. Este hallazgo podría indicar que efectivamente se está produciendo una activación del sistema inmune secundario a la exposición de proteínas de leche de vaca en los sujetos del estudio, ocasionando el proceso inflamatorio a nivel intestinal.

Aunque diferentes artículos postulan una posible implicación de las células T en la fisiopatología de las alergias no IgE mediadas (112), es una teoría que no se ha conseguido demostrar en ningún estudio hasta el momento actual. El primer estudio publicado que teoriza el papel de las células T en la fisiopatología de la enterocolitis alérgica data de 1985 por Van Sickle et al(111). Treinta y dos años después, en 2017, Goswami et al(113), analizan las poblaciones linfocitarias de pacientes con FPIES tras la prueba de provocación oral y no logran una explicación fisiopatológica clara de esta entidad no IgE-mediada y tampoco encuentra anticuerpos o respuestas de células T específicas. El mismo autor postula que quizás podrían encontrarse alteraciones de células T a nivel local en la mucosa gastrointestinal y que no tengan su manifestación periférica en la

sangre. Revisiones recientes(112)(114), cuestionan cada vez más el papel de las células T en la fisiopatología de las manifestaciones no IgE mediadas en base a estos hallazgos, y evidencian un papel más importante de las células de la inmunidad innata, especialmente neutrófilos, monocitos y eosinófilos como muestran los hallazgos de nuestro estudio.

En este punto cabe revisar la posible implicación de las células T descrita en estudios previos, dada la positividad de los parches de atopia (“patch test”) en algunos casos de alergia no mediada por IgE. En entidades como la dermatitis atópica, la implicación de células T se confirma por la positividad de esta prueba. Sin embargo, hay diferencias fenotípicas entre los linfocitos T cutáneos y gastrointestinales por lo que es difícil detectar estos linfocitos T en las pruebas cutáneas de pacientes con manifestaciones gastrointestinales de alergia no mediada por IgE. El estudio Fogg et al (115), realizado en pacientes con FPIES encuentra un VPP del 75% y VPN del 100% para el diagnóstico de esta entidad mediante los parches de atopia. Recientemente, el estudio del 2017 de Gonzaga et al(115), confirma una baja eficacia de los “patch tests” para predecir tolerancia en alergias no IgE mediadas. Este estudio evalúa la prueba de parches en niños con enterocolitis (FPIES) y proctocolitis (FPIAP) confirmadas con la prueba de provocación oral. Este método diagnóstico de parches fracasa en la identificación del 66,7% de pacientes con alergia no mediada por IgE comparado con el gold standard de la prueba de provocación oral. Por este motivo los autores concluyen que no se recomienda la prueba de parches en la práctica clínica rutinaria para el diagnóstico de alergias no IgE mediadas. Actualmente las guías de práctica clínica coinciden en esta recomendación.

6.2.3. ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS B

El análisis de las células B de los pacientes con proctocolitis indica que esta entidad no se debe a un mecanismo regulado por anticuerpos o por células B ya que no muestra diferencias significativas con respecto a los controles. Las células B reguladoras participan en el mantenimiento de la tolerancia y homeostasis inmune(116). En nuestro estudio, en la cohorte de casos, el aumento del subtipo celular de células B reguladoras BR1 puede indicar que efectivamente en la proctocolitis alérgica sí se produce una respuesta inflamatoria, y a su vez un

adecuado control de la misma por parte de estas células B reguladoras. Estudios previos(112),(113) tampoco encuentran anticuerpos específicos en entidades clínicas similares como las FPIES, sin embargo el estudio Noh(117), también describe un posible papel de las células B reguladoras productoras de IL-17 e IL-32 en la adquisición de la tolerancia inmunológica de alergia no mediada por IgE.

Algunos estudios postulan la idea de que estos mecanismos no IgE mediados se deban a anticuerpos IgG específicos frente a alimentos. Sin embargo esta hipótesis no se ha podido esclarecer hasta la fecha(118).

Por otra parte cabe destacar que hasta el 30% de las FPIES pueden tener títulos bajos de IgE específica contra el alérgeno causante a pesar de ser una alergia no mediada por IgE(119). Recientemente Caubet et al(111), han correlacionado estos valores de IgE como un marcador de FPIES persistente. Además, algunos pacientes que han superado una FPIES han desarrollado con los años otra alergia alimentaria IgE mediada. En este estudio cabe destacar que hasta tres pacientes con proctocolitis presentaron posteriormente alergia a huevo IgE mediada con sintomatología cutánea clásica y pruebas de InmunCAP y RAST positivas. Algunos autores especularon sobre la posibilidad de que se produzca IgE específica a nivel de mucosa intestinal, sin paso ni manifestación en sangre periférica (120). Sin embargo, estudios posteriores en los que realizan medición de inmunoglobulinas en las biopsias yeyunales en pacientes con enteropatía no IgE mediada, no demuestran incremento de IgE en las mismas y sí si elevaciones de IgM e IgA tras la prueba de provocación(121). Esto probablemente se deba a que durante el proceso inflamatorio se produce una alteración de la barrera intestinal, y como mecanismo de respuesta aumenten los niveles de la IgM e IgA locales como anticuerpos neutralizantes de la mucosa intestinal, con el fin de evitar el paso de antígenos extraños desde el lumen al interior de la mucosa durante la inflamación. Estudios posteriores, encuentran elevación de IgA específica a alimentos causantes de FPIES pero sin correlación clínica con los síntomas(122). También se ha descrito unos niveles menores de IgG4 específica en pacientes con FPIES(123),(124). Todos estos estudios indican que es poco probable que el mecanismo fisiopatológico por el que se origina la FPIES se deba a anticuerpos específicos a alérgenos alimentarios lo cual concuerda con los

hallazgos de nuestro estudio en el que no se ha objetivado una implicación de células B.

6.2.4. ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS

La función de las células T reguladoras (Treg) ha sido bien estudiada en las alergias IgE mediadas(94). En este tipo de alergia se evidencia una disminución de células Treg o desequilibrio con respecto a las células T memoria que permite un aumento y progresión de una respuesta inmunológica Th2 con producción de IL-4 y sintomatología clásica de alergia (urticaria, anafilaxia, etc). Las T-reg están implicadas, dada su función reguladora, en la adquisición de tolerancia oral(125),(126),(79). Estudios previos de inducción a la tolerancia (ITO) en distintas alergias alimentarias IgE mediadas muestran como al aumentar y recuperarse esta población celular se consigue alcanzar la tolerancia inmunológica(89),(127),(128),(129). Sin embargo, son muchos menos los estudios que analicen el papel de las células Treg en alergias no IgE mediadas, motivo por el cual se diseñó el presente estudio.

Dentro de estos estudios caben destacar dos: El primero realizado por Karlsson et al en 2004(128), compara las células CD4+CD25+ T reguladoras específicas en pacientes que habían superado una alergia no mediada por IgE a PLV con manifestación de FPIES con los que presentaban sintomatología activa. En este estudio se demuestra que los pacientes con resolución clínica mantienen mayor porcentaje de células T reguladoras, lo cual implica que estas células podrían jugar un papel importante en la inmunotolerancia. El segundo estudio, más reciente de Cseh et al de 2015(108), incluía pacientes con proctocolitis alérgica con sintomatología persistente tras la retirada de PLV, en los que se han tenido que realizar biopsias intestinales para confirmar el diagnóstico y tratar con fórmula elemental para resolver la sintomatología. La metodología de este último estudio podría ser cuestionable. Por una parte, por las características clínicas de los pacientes incluidos en su muestra, con dudosa justificación de la realización de técnicas invasivas a todos los pacientes (colonoscopia y toma de biopsias intestinales) o la utilización de fórmula elemental, dada sus limitadas indicaciones en las guías de práctica clínica y revisiones actuales. Por otra parte, las muestras y el análisis inmunológico realizado son diferente al realizado en nuestro estudio. El estudio de Cseh se realizó sobre células congeladas y, por tanto, muertas por

lo que los resultados de poblaciones inmunes solo se expresan en porcentaje y no en valores absolutos. Por ello es probable que el presente estudio obtenga resultados no concordantes con los obtenidos por Cseh et al(108). En éste estudio, se observa una disfunción inmunológica en los pacientes con colitis alérgica (respecto a los controles), con disminución significativa del número de células T-reguladoras ($p=0.03$), un aumento de la ratio naïve/células T memoria ($p=0,02$), disminución de células T activadas CD4+CD25+ ($p=0,01$) y predominio de linfocitos Th2 sobre Th1.

Tras los hallazgos de nuestro estudio, el análisis de células T reguladoras puede indicar que en la proctocolitis alérgica existe una función normal de las células T reguladoras dado que aumentan con el proceso inflamatorio en fase aguda (T0) y posteriormente tras normalizarse el cuadro clínico (Tres) vuelven a niveles normales (similares a los controles sanos). Esto explicaría que el mecanismo fisiopatológico por el que se produce la inflamación en la proctocolitis alérgica no se deba a un déficit o un desequilibrio de las células T reguladoras respecto a las células efectoras, al contrario de lo que sí sucede en la alergia mediada por IgE(127).

En relación al marcador Foxp3+, marcador definitivo para identificar las células T reguladoras(130)(131)(132), su correlación con las células T efectoras (TemRA) nos permite evaluar la capacidad de este subtipo celular CD4+ para controlar la respuesta inmunológica. La ratio Foxp3/TCD4+TemRA aumentado en los pacientes con proctocolitis alérgica indica una buena respuesta por parte de las Treg para controlar o limitar la respuesta inflamatoria, al contrario de lo que ocurre en la alergia mediada por IgE(114). Este buen control también se manifiesta en la correlación positiva de las Treg con las CM TCD4, cuyo cociente también se veía alterado en los niños con alergia a huevo mediada por IgE y mejoraba tras el tratamiento con SOTI(91),(133). Por tanto, en la proctocolitis, no sólo existe una población normal de células Treg sino que éstas además parecen ejercen una función adecuada controlando la proliferación de células TCD4+efectoras y las TCD4+CM al contrario de lo que ocurre en las respuesta inmunes Th2 como en la alergia mediada por IgE.

Estos dos últimos resultados apuntan a que la base fisiopatológica de la proctocolitis no parece ser una respuesta mediada por células T.

Respecto a la hipótesis del presente trabajo de tesis doctoral, tras estos hallazgos se puede concluir que **las células T reguladoras no tienen un papel en la fisiopatología inmunológica en la proctocolitis alérgica**. Se podría descartar que un déficit de estas Treg sea el responsable de la sintomatología, y sí parecen ejercer un buen control de la reacción inflamatoria que se produce por la ingesta de proteínas de leche de vaca, cuya causa permanece desconocida. Es probable que la normofunción de este grupo celular sea también la causa por la que no se desencadene la respuesta Th2 típica de las reacciones alérgicas IgE mediadas, y por tanto tampoco se active la producción de anticuerpos IgE por parte de las células B. Estos resultados deben ser comprobados en otras entidades alérgicas no mediadas por IgE por lo que abre nuevas líneas de investigación futuras.

6.2.5. ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES MIELOIDES (INMUNIDAD INNATA)

GRANULOCITOS

El número total de **granulocitos**, como representación de la población mieloides global encargada de las reacciones inflamatorias propias de la inmunidad innata, muestran diferencias significativas entre casos y controles. Además, se observa un descenso en el número total de granulocitos cuando la proctocolitis está resuelta clínicamente. Esto indica una activación del sistema inmune innato mediado por granulocitos que se activan originando la respuesta inflamatoria característica de la proctocolitis. Este hallazgo, junto con los resultados previos en la población linfocitaria, hace sospechar que probablemente el mecanismo fisiopatológico de este tipo de alergia no mediada por IgE radique en la inmunidad innata.

Además, tanto el porcentaje como número absoluto de granulocitos presentan adecuadas áreas bajo la curva ROC permitiendo un aceptable valor predictivo positivo lo que permitiría utilizarlo como marcador diagnóstico que diferencie la proctocolitis de pacientes sanos. El mejor punto de corte de estas

poblaciones, estimado en 1583 células/ μ L ofrece una alta sensibilidad y menor especificidad.

Dentro de los granulocitos, los neutrófilos totales también muestran diferencias respecto a los controles, pero con cifras mayores cuando la clínica está resuelta que cuando está en fase aguda. En el hemograma solo se identificó neutrofilia en dos pacientes. La leucocitosis con neutrofilia ha sido un hallazgo común de pacientes con FPIES aguda, pero no en pacientes con proctocolitis como en nuestra muestra. Estudios previos describen un pico de neutrófilos a las 6 horas de la provocación(134), que se ha confirmado en estudios posteriores(111),(14). Probablemente la neutrofilia sea secundaria a la secreción de citoquinas durante la reacción inflamatoria de la proctocolitis como por ejemplo IL-8, cuyos valores se muestran elevados en FPIES activa sugiriendo una participación de neutrófilos en estas reacciones(124). En cuanto a los monocitos, a pesar de que 6 pacientes muestran monocitosis en sangre periférica, en el estudio comparativo no hay diferencias significativas.

Los hallazgos de este estudio en cuanto a la elevación de granulocitos y neutrófilos, pueden explicar por qué la elevación de la calprotectina fecal (CPF) se ha propuesto como marcador en estudios recientes para el diagnóstico de alergia no mediada por IgE(135), implicando de nuevo a la inmunidad innata en la fisiopatología de este tipo de alergias. La calprotectina fecal es una proteína contenida en el citoplasma de neutrófilos, monocitos y macrófagos activados. Esta prueba permitiría descartar el diagnóstico de APLV no-IgE mediada con niveles inferiores a 138 μ g/g en heces según los estudios(108). En este estudio los pacientes con sospecha de alergia a proteína de leche de vaca que respondían bien a la retirada de PLV de la dieta (posible alergia no mediada por IgE) mostraban niveles superiores a los que no respondían (posible trastorno funcional), y éstos a su vez mayores a los controles sanos. Los niveles de CPF además se correlacionan con la clínica, presentando descenso de niveles en pacientes tras el inicio del tratamiento y mejoría sintomática. Otros estudios similares encuentran cifras más altas en el grupo que responde a dieta libre de PLV frente al que no responde(136).

EOSINÓFILOS

Dentro de las poblaciones mieloides, el grupo celular mejor estudiado en las alergias no IgE mediadas es el de **eosinófilos**, fundamentalmente por su acumulación en forma de abscesos crípticos en las biopsias intestinales de pacientes con proctocolitis (FPIAP) o enterocolitis alérgica (FPIES)(108)(137). Sin embargo, la acumulación de eosinófilos en el tracto gastrointestinal no es exclusivo ni mucho menos patognomónico de la alergia no mediada por IgE sino que también se ha visto en otras patologías gastrointestinales como gastroenteropatías eosinofílicas (trastornos mixtos), enfermedad inflamatoria intestinal e incluso reflujo gastroesofágico(111),(138). Por este motivo se ha llegado a pensar que los trastornos gastrointestinales eosinofílicos (actualmente clasificados dentro de reacciones alérgicas mixtas) y las alergias no IgE mediadas sean parte de un continuum con unos mecanismos inmunopatogénicos similares a los de proctocolitis(139).

Tras los hallazgos de este estudio, el número de **eosinófilos** aumentado podría constituir un marcador diagnóstico de la proctocolitis alérgica. Sin embargo, según las curvas ROC, este marcador no muestra un área bajo la curva lo suficientemente adecuada como para tener un punto de corte con buena sensibilidad y especificidad diagnóstica. Esto probablemente se deba a que no en todos los casos de proctocolitis se evidencia eosinofilia, presentando mayor número de falsos negativos, pero a nivel global este parámetro está más elevado que en los controles sanos. En un estudio reciente de Wada et al(140), se confirma este hecho observando una activación de eosinófilos (medida por la expresión CD69) tras una reacción aguda de enterocolitis alérgica en 5 pacientes sin llegar a modificar el número de eosinófilos en sangre pero sí elevando los valores fecales de neurotoxina derivada de los eosinófilos (EDN)(141). Los autores de este estudio cuestionan si la elevación fecal de endotoxina derivada de los eosinófilos se debe a una activación de los eosinófilos con degranulación de sus componentes o bien a un aumento de la permeabilidad intestinal dado que los eosinófilos son un componente normal de la mucosa intestinal. La activación de eosinófilos podría ser un evento desencadenado por el antígeno alimentario o un reflejo de la respuesta inmunológica o inflamatoria de las FPIES. Estos autores concluyen que son necesarios más estudios para esclarecer el papel de los eosinófilos en las reacciones alérgicas no IgE mediadas. Por tanto, parece ser

evidente la activación de esta población mieloide, con mayor manifestación intestinal que en sangre periférica, pero se desconoce el papel de los eosinófilos en la inmunopatogenia de la alergia alimentaria (si son causa o consecuencia de la inflamación). La elevación de sus productos de degranulación a nivel fecal se ha propuesto recientemente como principal marcador de alergias no IgE mediadas en niños(142).

BASÓFILOS

El aumento de **basófilos activados** se observa también en los casos de proctocolitis pero no alcanza diferencias estadísticamente significativas para considerarlo como posible marcador diagnóstico. No hay estudios sobre la implicación de los basófilos en la alergia no mediada por IgE. Estudios previos reconocen su capacidad para modular la inmunidad adaptativa siendo una fuente de citoquinas y mediadores de la respuesta Th2(143), entre otras cosas por su expresión de un receptor de alta afinidad por la IgE. Estudios previos en alergia mediada por IgE muestran cómo la medición de los basófilos activados por citometría de flujo podría utilizarse como test pronóstico para diferenciar pacientes con más sensibilidad clínica a las proteínas de leche de vaca de aquellos que estén alcanzando inmunotolerancia(87),(144). Por ello se ha propuesto el Test de Basófilos Activados como método para monitorizar pacientes con alergia mediada por IgE permitiendo saber cuándo realizar la prueba de provocación oral para confirmar inmunotolerancia (si el test de basófilos es negativo) o en caso de dudas diagnósticas en pacientes con discordancia clínico-inmunológica con los test alérgicos(145).

CÉLULAS DENDRÍTICAS

La elevación de las **células dendríticas mDC2** podría ser considerada también un posible marcador, dado que se encuentran más elevadas en los casos de proctocolitis aguda respecto a los controles. En concreto, las mDC2 son capaces de secretar IL12 e inducir polarización hacia Th1 además de favorecer la generación de linfocitos T citotóxicos. Las células dendríticas han sido estudiadas sobre todo en la alergia mediada por IgE residiendo su importancia en su capacidad para reconocer los alérgenos alimentarios a través de receptores y

estimular la respuesta Th2. Incluso se ha postulado un posible abordaje terapéutico basado en la inmunoterapia oral con células dendríticas(146). No hay estudios previos ni revisiones que analicen el papel de las células dendríticas en la alergia no mediada por IgE por lo que se desconoce su papel en esta patología.

CÉLULAS NATURAL KILLER

La elevación de **células NK16+56-** en los casos de proctocolitis traducen una inflamación local mediada por la inmunidad innata. Las células NK son células protagonistas de la respuesta innata con función citotóxica a través de la secreción de citoquinas(147)(148). Sus receptores inhibidores específicos son capaces de diferenciar las células normales de otras infectadas o tumorales. En concreto, las NK16+56- están más relacionadas con infecciones virales crónicas (VHC, VVZ) y tienen una capacidad citolítica menor que las NK 56+. Hay pocos estudios que analicen la correlación entre las NK y la alergia alimentaria IgE mediada y ninguno en no IgE mediada(149),(150). El estudio Cianferoni et al de 2017(151) estudia las células NK en la intolerancia mostrando niveles mayores de iNK o tipo I tras la inmunoterapia oral así como cambio en el perfil de citoquinas de Th2 a Th1. Esta población de NK tipo I actúan de forma similar a las células de la inmunidad innata activando la diferenciación de las células T durante la inducción de la respuesta adaptativa. El estudio Mori F et al(134), muestra como aquellos niños que reciben tacrólimus como tratamiento inmunosupresor tras trasplante de hígado y desarrollan más alergia oral post-trasplante tiene mayor nº y % de células NK56+ que los trasplantados de riñón sin este tratamiento, por lo que sugieren un papel de las células NK en el desarrollo de los procesos alérgicos IgE mediados de estos pacientes.

Todos estos hallazgos en las distintas poblaciones mieloides podrían indicar que el mecanismo fundamental que define el proceso inflamatorio en la proctocolitis alérgica podría encontrarse más en la inmunidad innata del huésped (mediado por las poblaciones mieloides de eosinófilos, basófilos y células dendríticas) que en un mecanismo de la inmunidad adaptativa (linfocitos T CD4 o CD8) a diferencia de la mayoría de reacciones alérgicas IgE mediadas.

Estos resultados son concordantes con un estudio reciente realizado en pacientes con enterocolitis o FPIES(113) en el que se observa una activación sistémica de células innatas que incluye neutrófilos, monocitos, eosinófilos, células NK y una redistribución de células T en la circulación periférica de pacientes con FPIES tras la prueba de provocación con PLV.

La posible implicación de las células de la inmunidad innata se ha propuesto también en los estudios más recientes que resumen los mecanismos fisiopatológicos involucrados en las FPIES(119),(112),(113). Sin embargo, el desencadenante por el cual se origina la sintomatología permanece aún desconocido.

Es probable que la implicación de la inmunidad **innata** en las alergias no IgE mediadas tengan mayor repercusión **a nivel local** (elevación de eosinófilos en biopsias intestinales, elevación de neurotoxina derivada de eosinófilos en heces o EDN, elevación de proteínas de neutrófilos y monocitos o calprotectina en heces) que a nivel periférico y podría ser a este nivel donde se centraran los estudios de marcadores específicos de alergia no mediada por IgE, y futuras líneas terapéuticas.

6.2.6. ANÁLISIS DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE CITOQUINAS

En nuestro estudio no se evidencian diferencias significativas en el porcentaje de células T productoras de citoquinas séricas IFN γ e IL-4 en los pacientes con proctocolitis frente a los controles. Esto podría indicar que el mecanismo inflamatorio que ocurre en esta entidad clínica no parece estar mediado por ninguna de las respuestas Th1 ni Th2.

Las citoquinas que más se han correlacionado en estudios previos con la fisiopatología de la enterocolitis alérgica son fundamentalmente el **TNF α y TGF β** a nivel fecal(112). Otros estudios postulan un posible papel del TNF α en la fisiopatología de la enterocolitis al encontrarse niveles elevados de esta citoquina en las heces de pacientes con manifestaciones gastrointestinales producidas por proteínas de leche de vaca(152),(153). El IFN γ , principal citoquina de la respuesta Th1 aumenta la acción de TNF α . Heyman et al(152) postulaban un mecanismo mediado por células T cuya citoquina proinflamatoria TNF α , elevada en estos pacientes, fuera la responsable del aumento de la permeabilidad intestinal,

responsable de la sensibilización del intestino a las PLV. También se ha descrito a nivel de la mucosa intestinal una disminución de TGFβ1. Esta citoquina tiene una función reguladora induciendo la supresión de células T, y por tanto protegiendo la barrera intestinal contra la entrada de antígenos como las PLV. Este desequilibrio TGFβ/TNFα a nivel de la mucosa intestinal sería el origen de la enterocolitis inducida por PLV(99).

En cuanto a la IL-4, el estudio Mori et al(154), describe niveles aumentados de IL-4 y disminuidos de IFNγ en los pacientes con enterocolitis por arroz tras la prueba de provocación oral, postulando así una probable implicación de las células Th2 en las FPIES. Tras la adquisición de tolerancia, estos mismos autores observan una elevación de IL-10 por lo que concluyen que las células T productoras de IL10 (que sería la población Treg) podrían tener un papel en la inmunotolerancia regulando la respuesta Th1 y Th2. El posible papel de IL-10 en la adquisición de tolerancia en pacientes con FPIES también se ha confirmado en estudios posteriores(124).

En nuestro estudio, existe una mayor elevación de células productoras de IL-17 en los casos de proctocolitis, lo cual probablemente evidencia la situación pro-inflamatoria de la proctocolitis alérgica. La IL17 contribuye al reclutamiento de neutrófilos en las zonas de inflamación además de estimular la producción de citoquinas como TNF que reclutan más neutrófilos y monocitos en lugar de activar al linfocito T(33). Esto podría explicar por qué no se encuentra un mecanismo fisiopatológico mediado por células T en la proctocolitis, y en cambio sí hay un mecanismo mediado por células de la inmunidad innata proinflamatorias. La elevación de TNFα y descenso de TGFβ encontrada en las heces de pacientes con alergia no mediada por IgE podría explicarse también por las citoquinas producidas por macrófagos tisulares, en vez de ser producidas por células T dado que, como se evidencia en nuestro estudio, no parece haber alteraciones en la población T implicada en la proctocolitis alérgica.

El estudio Noh de 2012(155) concluye que la respuesta de la subpoblación de células B reguladoras productoras de IL-17 e IL-32 es decisiva para la tolerancia inmunológica en la dermatitis atópica inducida por alergia no-IgE mediada.

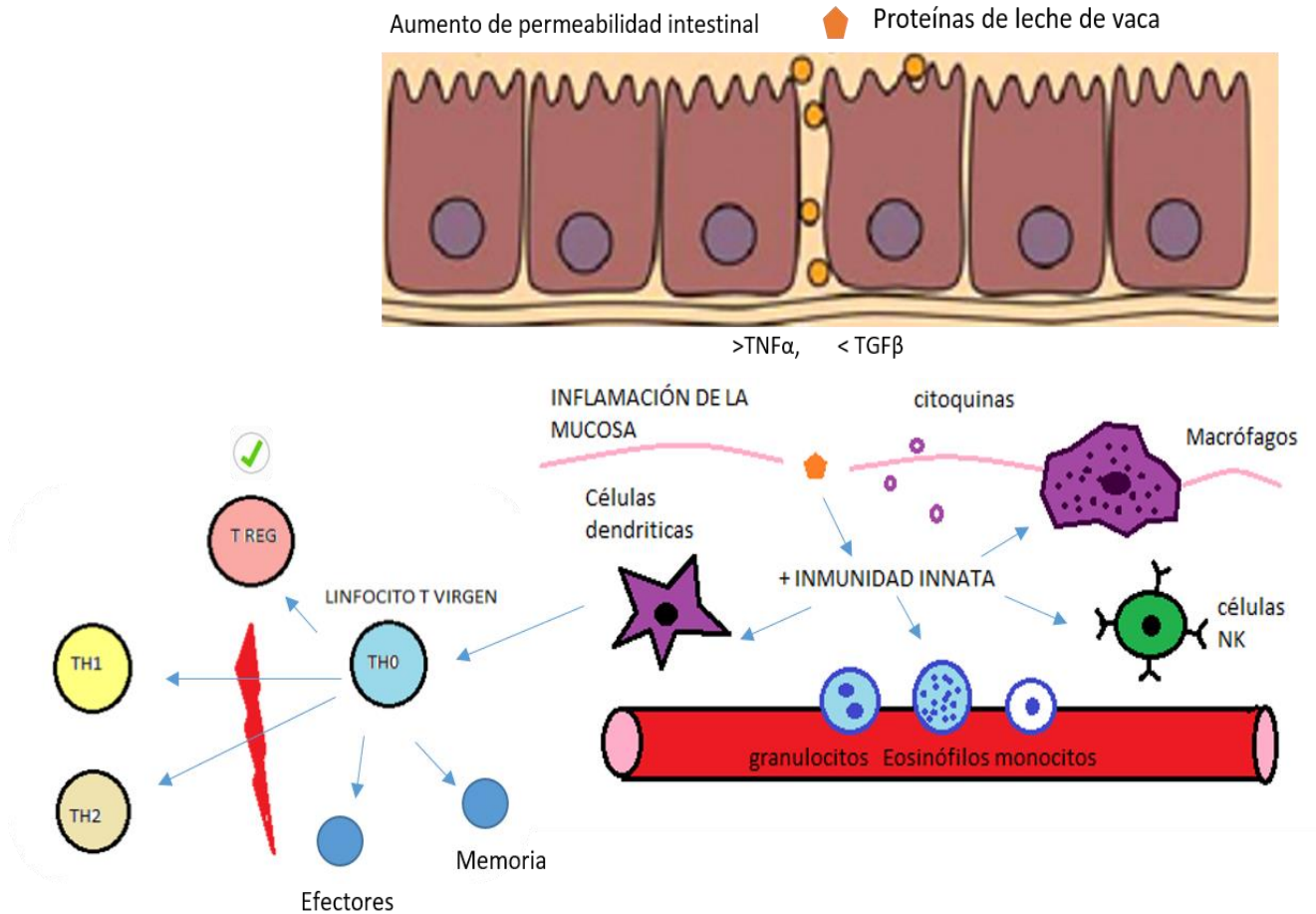
Otras citoquinas estudiadas en la fisiopatología de las alergias no IgE mediadas en los que se incluyen pacientes con proctocolitis, no evaluadas en nuestro estudio, son IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 cuyos niveles se mostraban más elevados junto a TNF α en comparación con los controles(156). El estudio de Kimura et al(117), encuentra niveles séricos elevados de IL-2, IL-5 e IL-8 en pacientes con FPIES tras la prueba de provocación oral. Dado que la IL-2 es una de las principales interleuquinas de la respuesta Th1 los autores sugieren un probable mecanismo inmunológico Th1 implicado en la fisiopatología de las FPIES. La IL-8 es una interleuquina quimiotáctica de neutrófilos y se encuentra elevada en estos pacientes por lo que se cree responsable de la neutrofilia observada durante la prueba de provocación oral.

6.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA PROCTOCOLITIS ALÉRGICA TRAS LOS HALLAZGOS OBSERVADOS

Tras los hallazgos de nuestro estudio, se podría afirmar que un déficit de **las células T reguladoras no parece constituir uno de los mecanismos fisiopatológico de esta entidad. El papel por tanto de las células Treg es controlar adecuadamente la expansión de células T en la inflamación producida en la proctocolitis. Las principales células que parecen implicadas en la esta entidad son células de la inmunidad innata, fundamentalmente granulocitos (con predominio de eosinófilos), células NK y células dendríticas.**

Se desconoce el mecanismo por el cual las proteínas de leche de vaca activan la respuesta inmunológica pero estudios previos evidencian un aumento de permeabilidad intestinal, al igual que sucede en la enfermedad celiaca, mediada por un desequilibrio entre las citoquinas $TNF\alpha$ y $TGF\beta$ (112). El origen de estas citoquinas se postuló en las células T, pero dada la poca participación de estas células demostrada en nuestro estudio, probablemente estas citoquinas se deriven más de los macrófagos tisulares como respuesta a la reacción inflamatoria mediada por células de la inmunidad innata. Al penetrar las proteínas de leche de vaca en la mucosa intestinal se produciría una activación de la inmunidad innata responsable de la inflamación mucosa y el acúmulo de eosinófilos en forma de abscesos crípicos observado en las biopsias intestinales. Las células dendríticas reconocerían el antígeno presentándose a los linfocitos T vírgenes con la producción de células efectoras y memoria. Sin embargo, a diferencia de las alergias IgE mediadas, en la proctocolitis, existe una normofunción de las células T reguladoras que aumentarían con la activación inmunológica, y así consiguiendo frenar y controlar la respuesta inmune adaptativa y evitando de forma especial la activación de la vía Th2 típica de las reacciones mediadas por IgE (Figura 35).

FIGURA 35. Resumen de hallazgos inmunofenotípicos de nuestro estudio de proctocolitis



En resumen, en la proctocolitis no parece haber una reacción celular T específica que explique la intolerancia a las PLV, sino más bien una reacción inflamatoria mediada por la inmunidad innata la cual explica el acúmulo de eosinófilos en las biopsias intestinales. Esta posible teoría fisiopatológica explica la ausencia de anticuerpos específicos en la proctocolitis, dado que no hay evidencia de activación de células B; la falta de citoquinas propias de respuesta Th1 y Th2; y la presencia de poblaciones celulares T CD4 parecidas a los controles sanos del estudio, así como el predominio de participación de las células de la inmunidad innata.

6.4. ESTUDIO DE PACIENTES SEGÚN EL SCORE CLÍNICO

El score clínico creado en este estudio gradúa la gravedad de la sintomatología en función de la clínica del paciente. No existe en la literatura un score clínico de proctocolitis pero se ha creado para poder comparar los pacientes en cuanto a la gravedad de la sintomatología.

En este estudio no se observa correlación entre la gravedad de la sintomatología y las variables clínicas como la edad de inicio de sintomatología, el tiempo en resolverse la misma, el tiempo de adquisición de tolerancia o la evolución de los datos antropométricos del paciente. No hay diferencias en el score clínico según el tipo de alimentación que tuviera el paciente previamente ni según el sexo o los antecedentes familiares de atopia.

Los pacientes que presentan un score clínico mayor al diagnóstico, esto es una sintomatología más intensa al diagnóstico de la proctocolitis alérgica, tienen un mayor porcentaje de basófilos en sangre. Por tanto, sólo los basófilos podrían ser un marcador de gravedad de la proctocolitis alérgica.

6.5. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LOS PACIENTES SEGÚN EL TRATAMIENTO RECIBIDO PARA LA PROCTOCOLITIS ALÉRGICA

Las distintas posibilidades terapéuticas para el manejo de la proctocolitis aguda no parecen influir en el tiempo de resolución de la clínica ni en la evolución antropométrica de los pacientes.

El desarrollo ponderoestatural de los pacientes a lo largo del seguimiento muestran una mejoría significativa tras la exclusión de PLV en la dieta, pero sin diferencias significativas entre los distintos grupos de tratamiento. Este dato concuerda con los estudios recientes que evidencian un crecimiento normal de los pacientes que reciben fórmulas extensamente hidrolizadas(157),(158).

Una de las limitaciones de este estudio es la falta de tamaño muestral suficiente para evaluar las diferencias de poblaciones celulares según el tratamiento recibido. Además, los tiempos de introducción de proteínas de leche de vaca (T1) y adquisición de tolerancia (T2) son orientativos según la práctica habitual basada en las guías clínicas y no según marcadores específicos que

orienten a la tolerancia digestiva a las PLV. Por ello es probable que no se observen en nuestro estudio diferencias significativas en el tiempo de adquisición de tolerancia en los pacientes que reciben probióticos añadidos a las fórmulas HePLV (*LGG*). El estudio de Berni(44) muestra como la adquisición de tolerancia es mayor en pacientes con tratamiento con HePLV con o sin probióticos frente a otras fórmulas (hidrolizado arroz, soja o elementales). Otros estudios publicados evidencian una mejoría más rápida de la sintomatología con disminución de valores de calprotectina en heces a los 4 meses de tratamiento y un tiempo de adquisición de tolerancia menor en niños con proctocolitis que reciben tratamiento con *LGG rhamnosus*(159),(76),(160),(161). Esta es la única cepa probiótica que ha demostrado eficacia moderada en la inducción a la tolerancia en APLV según la revisión sistemática realizada por Tan-Lim et al(76).

6.6. EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DEL FENOTIPO INMUNOLÓGICO

El tiempo de adquisición de tolerancia inmunológica en este estudio es un tiempo estimado por la evolución clínica del paciente, y según las guías de práctica clínica publicadas, dada la ausencia de marcadores pronósticos que orienten al clínico a la hora de reintroducir las PLV en la dieta del niño con proctocolitis.

Al analizar las poblaciones celulares que muestran diferencias significativas en los casos de proctocolitis con respecto a los controles y evaluar su correlación con la evolución clínica encontramos que existe una correlación positiva entre el %NK16+56-, el % de células T-reguladoras, el % y nº absoluto de células mDC2 y los valores de células productoras de IL17 con la edad de introducción de PLV y adquisición de tolerancia clínica a las PLV. Como muestran los resultados de nuestro estudio, durante el proceso inflamatorio de la proctocolitis alérgica se produce una elevación de células inmunológicas entre las que se encuentran las NK16+56-, las células dendríticas mDC2 o las células productoras de IL17. Estos hallazgos inmunofenotípicos de la proctocolitis no solo podrían tener un valor diagnóstico sino también un valor pronóstico. Aquellos pacientes que elevasen en mayor cantidad estos parámetros en el momento agudo de la enfermedad serían

los que tardasen más tiempo en adquirir la tolerancia inmunológica. Los eosinófilos no parecen correlacionarse con la evolución clínica del paciente.

Las células T reguladoras podrían tener un papel predictor de tolerancia inmunológica en la proctocolitis alérgica. Durante el proceso inflamatorio en la fase aguda se muestran en número y funcionalidad normal y por tanto se elevan para frenar la respuesta inmunológica. Una mayor elevación del % de estas células en la fase aguda de la enfermedad, se correlaciona con un mayor tiempo de adquisición de tolerancia inmunológica a posteriori. Serían necesarios estudios prospectivos con mayor tamaño muestral que confirmen estos resultados.

6.7. COMPARACIÓN DE HALLAZGOS INMUNOLÓGICOS DE LA PROCTOCOLITIS CON LAS ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS DE PACIENTES CON ALERGIA MEDIADA POR IGE

Tras los resultados obtenidos de este estudio podemos afirmar que se produce una evidente participación de la inmunidad innata en la fisiopatología de la proctocolitis. Las células de la inmunidad adaptativa (células T) parece que se activan tras el proceso inflamatorio pero el control que ejercen las células T reguladoras evita un desequilibrio inmunológico hacia Th2 evitando el paso a alergia mediada por IgE.

En la alergia mediada por IgE, sin embargo, las células T CD4+ Th2 son las principales mediadoras de la respuesta inmune responsable de la sintomatología. En ambas entidades alérgicas (IgE y no-IgE mediadas) se desconoce el desencadenante que activa la cascada de células inmunes que origina el proceso alérgico.

Un estudio reciente realizado por el grupo Perezabad et al (162), muestra las distintas poblaciones linfocitarias en el inicio de la alergia mediada por IgE comparada con controles sanos. Antes de comparar sus resultados con los obtenidos en nuestro estudio, cabe mencionar que los pacientes incluidos en ambos no son comparables dado que existe una diferencia clínicamente relevante de edades entre las dos muestras estudiadas. En el estudio Pérezabad, la media de edad de los pacientes fue de 6,4 meses y en nuestro estudio de 2,4 meses por lo que las diferencias obtenidas en el número de poblaciones linfocitarias podrían deberse no solo al tipo de alergia sino a la edad. Por tanto, sólo se pueden comparar las diferencias obtenidas entre los pacientes con respecto a su población control similar en edad y sexo.

Los resultados del estudio Perezabad(162) muestran como el porcentaje y número absoluto de células T CD4, CD8, células B y basófilos no muestran diferencias significativas entre ambos grupos salvo en las células T CD8 naïve que muestran niveles inferiores en el grupo de alergia mediada por IgE con respecto a los controles. En la tabla 23 se comparan los resultados de

poblaciones inmunológicas en APLV-IgE mediada publicados por Perezabad et al con nuestros resultados en proctocolitis alérgica en fase aguda o T0.

Tabla 23: Comparación de resultados de células inmunológicas en pacientes con APLV-IgE mediada(162) con los resultados de los pacientes con proctocolitis de nuestro estudio

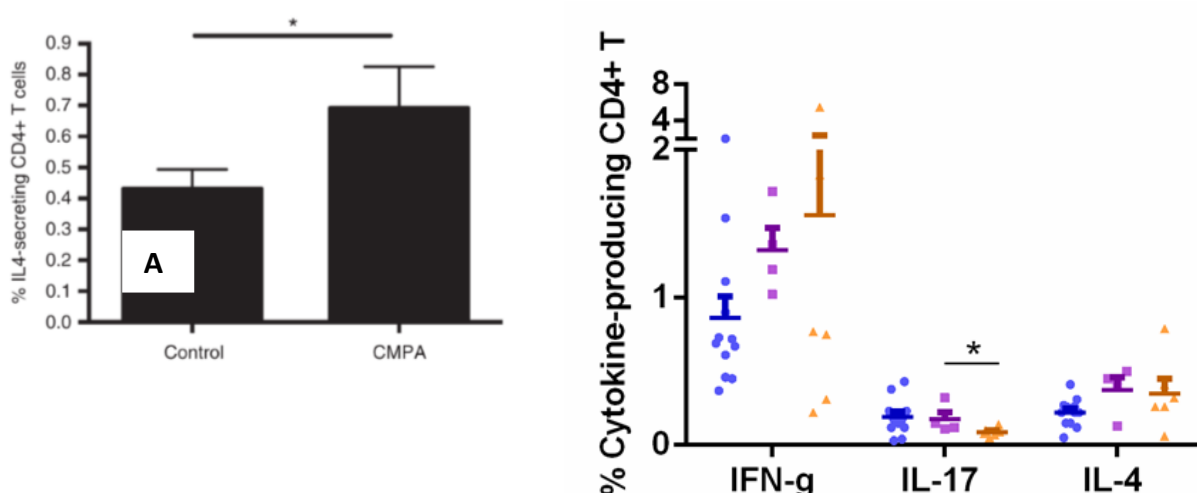
	% de células		Nºabsoluto de células (cell/ μ L)	
	APLV-IgE	Proctocolitis	APLV-IgE	Proctocolitis
Linfocitos totales				
Células T CD4+	49,81 \pm 2,89	46.22 \pm 7.33	2632 \pm 212	3181 \pm 849
Células T CD8+	12,69 \pm 1,17	13.88 \pm 4.25	642 \pm 46	925\pm225
Células B	24,64 \pm 1,69	22.88 \pm 7.21	1304 \pm 113	1526 \pm 739
Células T CD4+				
Virgenes/naïve	79,04 \pm 3,71	85.89 \pm 3.07	2151 \pm 210	2737 \pm 760
Central memory	10,03 \pm 1,07	10.68 \pm 2.50	236 \pm 16	337 \pm 109
Effector memory	1,63 \pm 1,08	0.07 \pm 0.06	19,8\pm5,0	2.31 \pm 1.61
Activadas	1,72 \pm 0.68	0.54 \pm 0.43	30,6\pm4,0	18.22 \pm 18.6
Células T CD8+				
Virgenes/naïve	77,35 \pm 6,04	88.74 \pm 9.05	477 \pm 45	815 \pm 198
Central memory	12,17 \pm 2,38	7.78 \pm 5.23	80,8 \pm 20,2	75.08 \pm 61.37
Effector memory	2,60 \pm 1,46	0.95 \pm 2.41	22,2\pm13,4	9.10 \pm 22.29
Activadas	6,58 \pm 2,85	1.07 \pm 2.25	48,0\pm22,9	11.38 \pm 27.64
Células B				
Naïve	90,55 \pm 0,74	93.47 \pm 2.06	1118 \pm 129	1430 \pm 710
Memory switch	1,09 \pm 0,14	0.87 \pm 0.56	13,3 \pm 1,8	13.00 \pm 9.19
Memory non-S	6,77 \pm 0,66	2.68 \pm 1.41	86,2\pm9,6	38.01 \pm 21.4
B reguladoras	1,72 \pm 0,30	13.08 \pm 6.46	21,2\pm3,0	0.09 \pm 0.03

	% de células		Nº absoluto de células (cell/ μ L)	
	Basófilos	0,65 \pm 0,08	0.80 \pm 0.41	57,1 \pm 7,3
Basófilos activados	38,13 \pm 4,73	36.13 \pm 16.73	23,0 \pm 5,0	30.99 \pm 23.98

No se ha podido realizar un estudio estadístico comparativo entre estas poblaciones celulares puesto que los pacientes no son comparables en edad. Sin embargo, en la muestra de pacientes con APLV mediada por IgE destaca una mayor participación de células T CD4 y CD8 activadas y por otra parte, en nuestros pacientes con proctocolitis, destaca una mayor participación de basófilos (células de inmunidad innata) lo cual apoya los resultados obtenidos en nuestro estudio.

En el estudio Perezabad(162), el porcentaje de células productoras de IL-4, principal citoquina de las respuestas Th2, fue mayor en el grupo de APLV-IgE mediado frente a los controles a diferencia de lo que ocurría en nuestro estudio de proctocolitis (Figura 36).

FIGURA 36. Comparación de células T CD4+ productoras de IL-4 en pacientes con APLV-IgE mediada o CMPA (A)(162) con pacientes con proctocolitis no-IgE mediada de nuestro estudio(B).

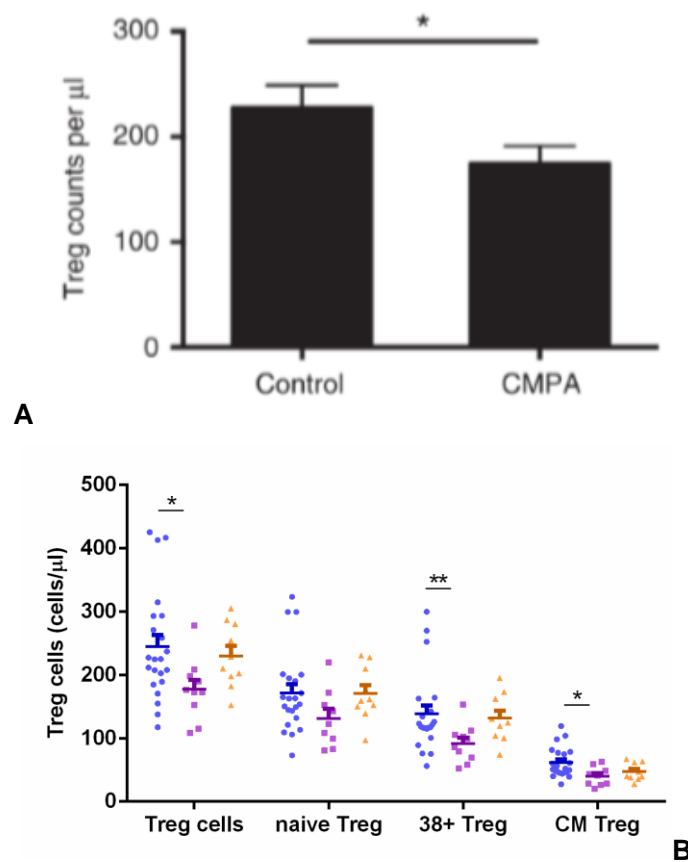


6.7.1. COMPARACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS

Los valores absolutos de **células T reguladoras** en pacientes con APLV-IgE mediada del estudio Perezabad et al(162), muestran valores menores respecto a los controles ($p=0.040$). Esto difiere de lo que ocurre en nuestro estudio con

pacientes con proctocolitis en el que los valores de células T reguladoras son iguales a los controles con valores mayores de Treg CM en la fase aguda (Figura 37). Esto indica que en proctocolitis alérgica, a diferencia de APLV-IgE mediada, los valores de células T reguladoras están preservados.

FIGURA 37. Comparación de resultados de nº absoluto de T-reg en pacientes con APLV-IgE mediada o CMPA (A) frente a pacientes con proctocolitis aguda de nuestro estudio (B).



Tras los hallazgos de Perezabad(162) sobre APLV-IgE mediada se concluye que el déficit de células T reguladoras y Vitamina D parece ser el responsable de la aparición y establecimiento de las reacciones alérgicas IgE mediadas frente a PLV.

6.7.2. COMPARACIÓN DE LA FISIOPATOLOGÍA DE AMBAS REACCIONES ALÉRGICAS EN FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS

En comparación con la proctocolitis alérgica, los valores preservados de Treg hacen que se bloquee la formación de células T CD4+ secretoras de IL4 y por tanto no se produce el fenotipo alérgico TH2 característico de las APLV IgE mediadas (Figura 38).

FIGURA 38. Papel de las células Treg en la proctocolitis no-IgE mediada tras los resultados de este estudio.

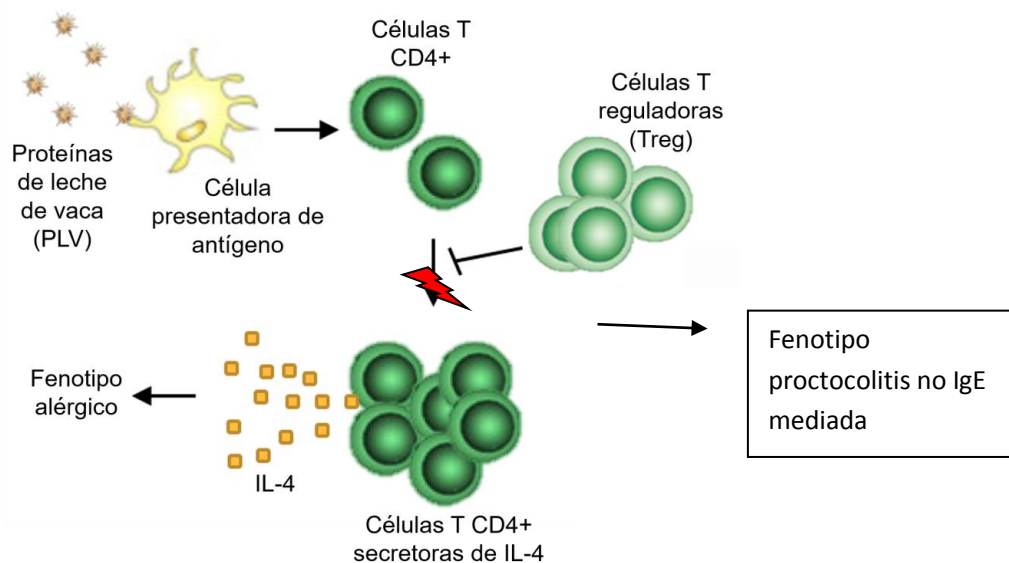


Imagen cedida por Bernaldo de Quirós E y Rocha-Correa R. Modificada del estudio Bernaldo de Quirós (127).

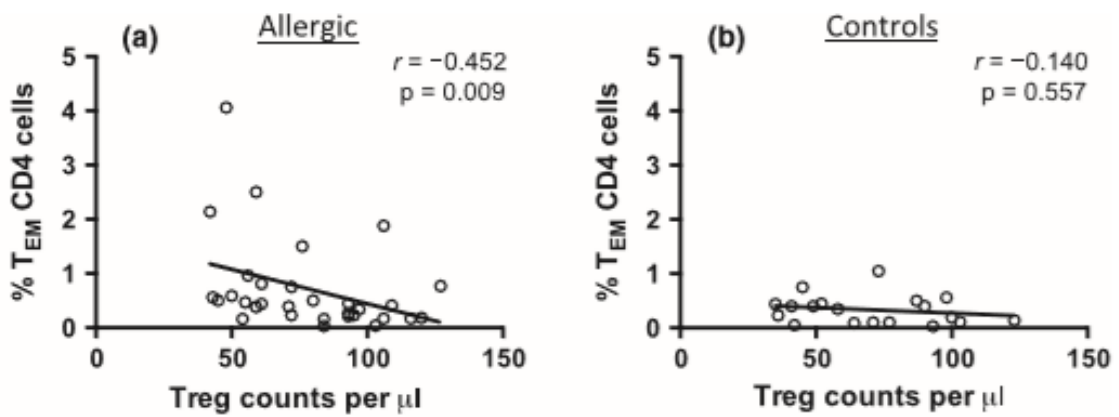
6.7.3. COMPARACIÓN DEL COCIENTE Treg/TEM CD4

Otra diferencia en la fisiopatología inmunológica de estas reacciones reside en el **cociente Treg/TEM CD4**. Este cociente define la relación que existe entre el porcentaje de células T reguladoras y el de células T CD4+ efectoras. En condiciones normales, al activarse la inmunidad adquirida por la presentación del alérgeno, se activan las células T efectoras, memoria y las T reguladoras que controlarán que las anteriores no se disparen. Por tanto, los niveles T reg/TEM CD4 deberían estar elevados si hay un buen control de la respuesta inmunológica y bajos si hay un descontrol. En el estudio publicado por Fuentes-Aparicio et al sobre inmunoterapia (SOTI) en alergia a huevo IgE mediada, se consigue una elevación de esta ratio Treg/TEM CD4 tras SOTI tras normalizarse los valores de

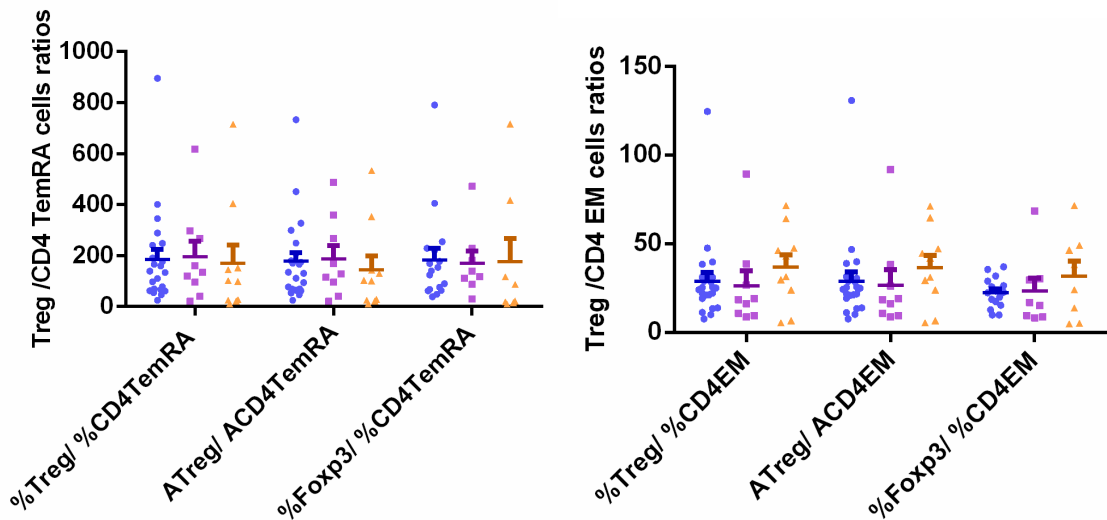
células T reguladoras con la inmunoterapia (91). El desequilibrio entre Treg y TEM CD4 en la fase aguda de la alergia a huevo se diferencia del equilibrio hallado en los controles de este estudio, que coincide con el equilibrio encontrado en pacientes con proctocolitis alérgica (Figura 39). Este equilibrio T reg/TEM CD4 es el responsable de la no activación de las células Th2 y del fenotipo alérgico.

FIGURA 39. Comparación de cociente Treg/TEM CD4 en pacientes con alergia mediada por IgE a huevo del estudio Fuentes-Aparicio (A) con los pacientes con proctocolitis alérgica.

A



B



6.7.4. COMPARACIÓN DE VALORES DE VITAMINA D

Otro objetivo del estudio era analizar los valores de vitamina D dado que es una hormona reguladora de la supervivencia de las células T reguladoras en humanos(68),(163). A diferencia de las publicaciones de alergia mediada por IgE en la que se muestran resultados de vitamina D significativamente menores que en los controles(162),(164); en este estudio no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles sanos (Tabla 24).

Tabla 24. Comparación de diferencias entre casos de APLV-IgE mediada(162), proctocolitis y sus controles; respecto a valores de Vitamina D.

	APLV-IgE mediada			Proctocolitis		
	CASOS	CONTROLES	<i>p</i>	CASOS	CONTROLES	<i>p</i>
Vitamina D µg/L	35,5±3,5	47,9±3,7	0,041	22,89±16,5	14,7±4,5	0,208

Cabe destacar en este punto la diferencia de valores de Vitamina D entre los pacientes de con alergia mediada por IgE que son mayores a los que presentan los pacientes con proctocolitis de nuestro estudio. Sin embargo, estos valores no muestran diferencias significativas cuando se comparan con los respectivos controles sanos de la misma edad. Esto se puede deber a que los pacientes incluidos en el estudio de APLV-IgE mediada no son comparables en cuanto a edad con los de nuestro estudio de proctocolitis, como se ha comentado previamente. Esta diferencia de edades influye probablemente no solo en los valores de las poblaciones inmunológicas sino también de los valores de Vitamina D. Actualmente se desconocen los valores de normalidad de la Vitamina D en niños sanos. Solo hay un estudio realizado en niños que incluye lactantes menores de 3 meses en el que los valores de Vitamina D estuvieron entre 7.8-11.3 mg/dL(165). Sin embargo, aunque se excluyeron enfermos renales y críticos, los niños que se incluyeron en el estudio estaban ingresados en los hospitales por otras patologías por lo que no se pueden considerar valores de normalidad como tal.

Otro hallazgo de nuestro estudio es una correlación negativa de valores de vitamina D con las células NK 16+56+ y positiva con las células B reguladoras (BR1) que probablemente traduzca la función inmunorreguladora de esta

vitamina, disminuyendo las células NK en el proceso inflamatorio y aumentando los niveles de células B reguladoras para frenar la reacción inmunológica.

Los valores de Vitamina D de los pacientes del estudio no parecen influir en la evolución clínica en cuanto al tiempo de adquisición de tolerancia a las proteínas de leche de vaca, si bien este tiempo es orientativo según la clínica del paciente como se ha explicado.



CAPÍTULO 7: APLICACIONES PRÁCTICAS Y NUEVAS LÍNEAS DE ESTUDIO

7.1. APLICACIONES PRÁCTICAS

Los resultados de nuestro estudio sobre los hallazgos inmunofenotípicos encontrados en los pacientes con proctocolitis alérgica podrían ofrecer aplicaciones prácticas fundamentalmente en la identificación de marcadores para el diagnóstico de proctocolitis así como marcadores pronósticos de tolerancia y nuevas líneas de tratamiento.

7.1.1. MARCADORES DIAGNÓSTICOS DE PROCTOCOLITIS

Los marcadores inmunofenotípicos con mejores áreas bajo la curva ROC, es decir, mejor capacidad diagnóstica de proctocolitis en este estudio han sido el número absoluto de células NK16+56- y el número de granulocitos. Sin embargo, estos marcadores no están disponibles en los laboratorios habituales. Además, sería necesario un estudio coste-eficacia que evaluara la rentabilidad de estos marcadores. Por ello, creemos que deberían considerarse hallazgos fenotípicos más que marcadores diagnósticos de proctocolitis en el momento actual. Los eosinófilos en sangre están elevados de forma comparativa con los controles, pero tienen poca capacidad diagnóstica como marcador probablemente porque no en todos los pacientes se elevan. Esta población tiene más utilidad diagnóstica cuando se evalúa a nivel intestinal local (mediante EDN o biopsia intestinal) que a nivel periférico en la sangre. Los basófilos activados también muestran cifras más elevadas en pacientes con proctocolitis pero sin obtener diferencias significativas por lo que a priori no parece ser un buen marcador diagnóstico. Serían necesarios más estudios para evaluar concretamente estas poblaciones celulares de la inmunidad innata en pacientes por ejemplo con sintomatología menor y ver si son capaces de discriminar a los alérgicos de los trastornos funcionales utilizando la provocación oral como técnica diagnóstica *gold estándar*.

MARCADORES FECALES DE INFLAMACIÓN INTESTINAL

Una de las principales conclusiones de este estudio es que la fisiopatología de la proctocolitis se centra más en la inmunidad innata que en un mecanismo mediado por células T propuesto durante años en estudios previos sin llegar a confirmarse. Este hallazgo debería orientar nuevas líneas de estudio de las alergias no mediadas por IgE centradas en la inmunidad innata. Dentro de éstas, cabe mencionar la detección de productos de degradación de neutrófilos y

monocitos (calprotectina fecal) o la endotoxina derivada de los eosinófilos (EDN) a nivel fecal.

1. CALPROTECTINA FECAL

La calprotectina fecal es una proteína citosólica de unión Ca^{2+}/Zn presente en neutrófilos y monocitos. Tiene acción antimicrobiana al privar a los microorganismos de zinc, acción inmunomoduladora y antiproliferativa(166). El aumento de los niveles de calprotectina fecal sugieren inflamación de la mucosa intestinal y se correlaciona con los hallazgos histológicos obtenidos de la endoscopia y biopsia de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal tanto en niños como adultos(166). Su determinación en heces es sencilla y no invasiva y se asocia a un aumento de migración de neutrófilos hacia la luz intestinal.

Se han estudiado distintos marcadores fecales de inflamación intestinal en las FPIES: β -defensina, proteína catiónica del eosinófilo, TNF- α , y calprotectina fecal siendo éste último el que parece tener mayor rentabilidad diagnóstica en las FPIES(167).

La tabla 25 resume los estudios publicados sobre este marcador en el diagnóstico de alergias no-IgE mediadas basado en la revisión de Khan(167).

Tabla 25. Estudios de calprotectina fecal como marcador diagnóstico de enterocolitis inducida por proteínas de leche de vaca

ESTUDIO	TIPO MUESTRA	HALLAZGOS DE CALPROTECTINA FECAL $\mu\text{g/g}$		
			Antes dieta	Tras dieta
Beşer, 2014 (168) Turquía	19 controles			
	24 APLV-IgE	Controles	296 (94)	
	8 APLV no-IgE	APLV IgE	392 (209)	218 (90)
		No-IgE	886 (278)	359 (288)
		p	<0.01	0.025

ESTUDIO	TIPO MUESTRA	HALLAZGOS DE CALPROTECTINA FECAL $\mu\text{g/g}$			
		% cambio tras provocación	Calprotectina	IgA	β -defensina
Merreas-Salmio,2014 (136) Finlandia	18 APLV IgE				
	39 no IgE				
	Marcadores fecales	IgE	15%	-11%	23%
		No-IgE	18%	-2.2	39%
Belizón,2016 (136) España	N=82		Media	p	
	40 no-IgE	APLV-nolIgE	442,65	<0.0001	
	30 controles	Control	100,30		
Niveles calprotectina 138 $\mu\text{g/g}$: excluyen APLV-no IgE mediada.					

- Modificado de revisión de Khan(167).

De estos tres estudios destaca los hallazgos de Belizón et al(136), dado que ofrece un punto de corte para poder descartar alergia no-IgE mediada. Este estudio incluye pacientes con sintomatología menor o atípica que resultan difíciles de diagnosticar dada la clínica inespecífica y las pruebas alérgicas negativas. Es un importante hallazgo que podría utilizarse en combinación con la escala CoMiss para el diagnóstico diferencial de los trastornos funcionales.

Un estudio reciente realizado por Roca et al(169), evalúan los valores de normalidad tanto de calprotectina fecal como de endotoxina derivada de eosinófilos por primera vez en niños sanos. Los resultados de este estudio confirman que las concentraciones de los valores de calprotectina fecal en niños sanos son mayores a los publicados en adultos sanos proponiendo además puntos de corte de normalidad en pacientes pediátricos en tres cohortes de edad. Los valores de normalidad para los lactantes de 0-12 meses de edad estarían entre 910,3-7,4 mg/kg.

En nuestro hospital la técnica de laboratorio de calprotectina fecal se incluyó a partir de 2016 por lo que no se utilizó este marcador para el estudio de pacientes con proctocolitis.

2. ENDOTOXINA DERIVADA DE EOSINÓFILOS (EDN).

El principal estudio que evalúa la utilidad de este marcador para el diagnóstico de APLV-no IgE mediada es el estudio Kalach(142). En este estudio se incluyeron 11 pacientes con APLV confirmada con sintomatología digestiva (IgE y no IgE mediada) tras provocación oral y se compararon entre ellos diferentes pruebas alérgicas (IgE e IgG a PLV y prick test), digestivas (test de permeabilidad intestinal, marcadores fecales TNF α , α 1antitripsina, calprotectina, β -defensina2 y EDN) y microbiológicas (cuantificación de microbiota y detección de especies de *Bifidobacterium*). El estudio concluye que el test con mayor eficacia diagnóstica fue el de permeabilidad intestinal y el EDN fecal que destaca por la simplicidad de la determinación con solo una muestra fecal del paciente.

Sin embargo, son necesarios más estudios de marcadores fecales que permitan:

- Determinar la capacidad diagnóstica de APLV no mediada por IgE frente a otras patologías. Esto permitiría diferenciar por ejemplo los trastornos funcionales digestivos de los síntomas menores de alergia. Sería necesario correlacionar estos marcadores con la escala CoMiss para el diagnóstico de síntomas menores(24). También podrían utilizarse para el diagnóstico diferencial de FPIES agudas y crónicas con otras patologías y evaluar su correlación con la clínica.
- Monitorizar la inflamación intestinal en los pacientes con APLV no mediada por IgE para intentar reintroducir las proteínas de leche de vaca lo antes posible en la dieta. Actualmente no existe ningún marcador que nos oriente sobre la tolerancia del paciente hacia este alérgeno por lo que en la práctica clínica habitual se reintroducen a los 6-9 meses del inicio de la sintomatología según las guías de práctica clínica.

7.1.2. MODIFICACIÓN DE LA CLASIFICACIÓN DE REACCIONES ALIMENTARIAS

Tras los hallazgos obtenidos del estudio donde claramente se muestran diferencias entre la APLV IgE mediada y la no-IgE mediada, quizás se debiera replantear la modificación de la clasificación de reacciones alimentarias. La

“proctocolitis alérgica” debería denominarse “proctocolitis inflamatoria” dado que no se ha demostrado un mecanismo alérgico clásico entendido como activación de la respuesta Th2 ni un mecanismo específico de células T. Previamente estas patologías se clasificaron como “intolerancia a las proteínas de leche de vaca” en lugar de “alergia no mediada por IgE”. Cabe reconocer en este punto que un pequeño porcentaje de pacientes con alergias no IgE mediadas tiene anticuerpos IgE específicos que quizás debieran denominarse “alergias IgE mediadas con sintomatología FPIES”. Otro porcentaje de pacientes con APLV-no IgE mediada tienen una sintomatología más persistente siendo más frecuente encontrar en ellos un InmunoCAP o IgE específica positiva cuando al diagnóstico era negativa. Por ello, parece necesario monitorizar estos anticuerpos y valorar realizar una determinación sérica previa a la reintroducción de PLV en la dieta del paciente en pacientes con proctocolitis alérgica.

7.2. PROPUESTAS DE NUEVAS LÍNEAS DE TRATAMIENTO Y ESTUDIO.

Tras los hallazgos del estudio y la revisión bibliográfica realizada, se podrían proponer nuevas líneas de tratamiento de las alergias no-IgE mediadas destinadas a:

1. Mejorar la **permeabilidad intestinal** de los pacientes diagnosticados de alergias no mediadas por IgE. Esto permitiría reducir o impedir la entrada de proteínas de leche de vaca al interior de la mucosa intestinal y evitaría el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria. Existen nuevos tratamientos con productos no farmacológicos como las gelatinas y xyloglucano que protegen la barrera mucoprotectora en la mucosa intestinal mejorando la resistencia de la misma a agresiones y ayudando a recuperar la función normal del intestino. Actualmente su uso está estudiado únicamente en pacientes con diarrea aguda.
2. Disminuir la **inflamación de la mucosa** para reducir las poblaciones de eosinófilos, células dendríticas y células NK en el paciente. En este sentido, las nuevas guías de manejo de las FPIES(114), aceptan el uso de una dosis única de corticoides a 1 mg/kg/d en el tratamiento agudo de la enterocolitis alérgica tras la expansión con volumen isotónico al paciente. La necesidad de tratamiento antiinflamatorio para el manejo de alergias mediadas por IgE debería valorarse en cada paciente según el riesgo beneficio dado los efectos secundarios de estos

tratamientos. En el caso de los pacientes con proctocolitis alérgica, dado que la resolución de la sintomatología se produce de media a las 48-96 horas de la retirada de PLV en la dieta, no estaría indicado estos tratamientos.

3. Acelerar la **tolerancia** del paciente a las proteínas de leche de vaca. Estudios previos han demostrado que aquellos pacientes con FPIES que adquieren la tolerancia a PLV tienen más células T reguladoras que aquellos en los que persiste la sintomatología tras la provocación(128). En esta línea de tratamiento existen dos posibles terapias que podrían favorecer la tolerancia intestinal a las PLV en la alergia-no IgE mediada: la vitamina D y los probióticos.

Vitamina D: Existe un porcentaje de pacientes con sintomatología mediada por IgE que evolucionan a alergia mediada por IgE a otros alimentos. Quizás se deba a una pérdida del equilibrio Treg/TEM que origina las respuestas Th2. Las terapias encaminadas a mantener este equilibrio, como por ejemplo mantener niveles adecuados de Vitamina D para asegurar el suficiente número de células Treg, podrían ser posibles tratamientos para la prevención de APLV mediada por IgE en estos pacientes. Estudios previos muestran como los lactantes con niveles mayores de vitamina D al nacimiento y hasta los 6 meses tienen menos reacciones de dermatitis atópica por inhibición de citoquinas como IL5 e IL13(170). Algunos autores sugieren esta suplementación desde el embarazo dado que se ha asociado niveles bajos de Vitamina D en embarazadas con menores niveles de células T y B reguladoras y mayor probabilidad de alergia y asma en los recién nacidos(171),(172),(173).

Probioticoterapia: Estudios previos muestran como en las alergias no mediadas por IgE existen una población menor de *Bacteroides* que en pacientes sanos tras 6 meses de dieta de exclusión de PLV(174)(142). Por otra parte, el estudio de Berni Canani muestra como la administración de probióticos, en concreto *Lactobacillus rhamnosus* GG (*LGG*), a las fórmulas hidrolizadas extensas de PLV acelera la tolerancia intestinal a estas PLV(157). El tratamiento precoz con *LGG* asociado a éstas fórmulas ha demostrado ser una estrategia coste-efectiva en estudios recientes dado que con la adquisición de tolerancia precoz se disminuyen los costes derivados del consumo de éstas fórmulas tanto

en España(175), como en otros países (176),(177). Así mismo, existen diferencias en la microbiota de los pacientes con APLV tratados con hidrolizados de arroz que conduce a una menor tolerancia de PLV(174). En nuestro estudio, no se ha podido comprobar las diferencias de adquisición de tolerancia oral según el tratamiento, en parte a la falta de tamaño muestral en el grupo T resolución. Para poder realizar este estudio se debería realizar provocaciones a los pacientes en distintos tiempos tras la resolución de la sintomatología lo que equivale a realizar un ensayo clínico. Sería interesante medir la población de células Treg en estos tiempos y comparar según el tratamiento con HPLV con y sin probióticos.

Como líneas futuras de estudio, es necesario ampliar el conocimiento de la fisiopatología de APLV desde la primera línea de defensa que es la mucosa intestinal. En este contexto, se considera necesario más estudios orientados a explicar el mecanismo por el cual las proteínas de leche de vaca desencadenan la respuesta inmunológica (inflamatoria o Th2) en unos pacientes y no en otros. Quizás pueda deberse a fenotipos genéticos específicos, como en la enfermedad celiaca (DQ2 o DQ8) que predispongan a la alergia alimentaria. La determinación en los pacientes de estos fenotipos inmunológicos podría facilitar el diagnóstico precoz o el tratamiento preventivo de las alergias alimentarias.



CAPITULO 8: LIMITACIONES DEL ESTUDIO

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Las limitaciones de nuestro estudio son las siguientes:

- El tiempo en reclutar pacientes fue más prolongado de lo esperado porque tras las nuevas guías ESPGHAN se derivaba menos al especialista y muchos pacientes con proctocolitis alérgicas fueron manejados desde Atención primaria. Además, la recogida de controles sanos ha sido costosa y lenta dada la dificultad para encontrar lactantes de 1-2 meses de edad con necesidad de realizar un control analítico, y sin enfermedades inflamatorias ni digestivas intercurrentes.
- En nuestro estudio solo se han incluido proctocolitis alérgicas diagnosticadas en la consulta de Digestivo infantil. Teniendo en cuenta la prevalencia de esta enfermedad y los casos reclutados en 3 años, muchos casos de proctocolitis que no hayan acudido a la consulta estarán siendo manejados desde Atención Primaria. Esto probablemente indique que los casos enrolados sean los más graves o persistentes y probablemente afecte a la validez externa del estudio.
- No se ha podido comparar un mismo paciente en distintos tiempos T0 o T resolución porque no estaba justificado, según recomendaron desde el Comité de ética de nuestro Centro, realizar más de una analítica a los pacientes con proctocolitis si había resolución de la sintomatología como sucedía en los pacientes reclutados.
- Los valores de las poblaciones inmunológicas muestran una elevada dispersión que refleja la heterogeneidad de los pacientes. Esto podría deberse a que se recogieron las muestras para el análisis de células inmunológicas en distintos momentos de la evolución. Se les hacía la analítica en función del tiempo que llegaran a la consulta con la condición de que estuvieran con el cuadro agudo (T0) o con el cuadro resuelto (Tres).
- Los tiempos del estudio T1 y T2 son orientativos según los tiempos de consulta o indicación médica según práctica clínica habitual, lo que no corresponde en ocasiones al tiempo real de adquisición de la tolerancia.

Además, aparte de la prueba de provocación o reintroducción de PLV, no hay ninguna prueba analítica objetiva que nos pueda sugerir si el paciente esté adquiriendo tolerancia a las PLV.

- Solo se analizaron las células inmunológicas a nivel de sangre periférica y no a nivel gastrointestinal local donde proponen algunos autores, en forma de hipótesis no demostradas, una posible implicación de células T o linfocitos intraepiteliales. Esta posibilidad fue descartada, ya que no está éticamente justificado hacer biopsia intestinal para el diagnóstico de proctocolitis alérgica tal y como indican las guías de práctica clínica.



CAPITULO 9: CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Tras los resultados y discusión de nuestro estudio se puede concluir que:

1. En la proctocolitis no se evidencia una deficiencia o alteración de las células T reguladoras que pueda estar implicada en el desarrollo de la enfermedad. Este tipo celular parece ejercer una función normal dado que se evidencia un buen control de éstas sobre la proliferación de células TCD4+efectoras.

2. No se ha podido demostrar el carácter predictivo de los valores de células T reguladoras en la adquisición de tolerancia oral en los tiempos estudiados.

3. Los diferentes tratamientos de proctocolitis alérgica no producen diferencias significativas en la evolución clínica de los pacientes.

4. La falta de valores aumentados de células T productoras de citoquinas de tipo Th1 y Th2 y los recuentos de poblaciones celulares CD4 parecidas a los controles sanos van a favor de una escasa participación de la inmunidad adaptativa en la fisiopatología de la proctocolitis alérgica. No parece deberse a una respuesta mediada por células T (ni Th1 ni Th2).

5. El papel fundamental que define el proceso inflamatorio en la proctocolitis alérgica se encuentra más en la inmunidad innata del huésped que en un mecanismo mediado por células T o B a diferencia de la APLV mediada por IgE. Se caracteriza por una respuesta mediada por un aumento de células NK16+56-, eosinófilos y células dendríticas (mDC2).

6. Los valores de vitamina D en los pacientes con proctocolitis no muestran diferencias significativas con respecto a controles de la misma edad, a diferencia de lo que ocurre en la APLV mediada por IgE.

7. La elevación de granulocitos, eosinófilos, células NK y dendríticas podrían constituir marcadores de interés clínico en patologías no mediadas por IgE como es el caso de la proctocolitis alérgica. Éstos podrían utilizarse para

diferenciar trastornos digestivos funcionales de los síntomas menores de alergia no mediada por IgE.



CAPITULO 10: BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis : missing immune deviation , reduced immune suppression , or both ? *Immunology*. 2004;112:352–63.
2. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):291–307.e5.
3. Gamboa PM. The epidemiology of drug allergy-related consultations in Spanish Allergology Services: *Alergológica-2005*. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(2):45–50.
4. Vandenplas Y, Alarcon P, Alliet P, De Greef E, De Ronne N, Hoffman I, et al. Algorithms for managing infant constipation, colic, regurgitation and cow's milk allergy in formula-fed infants. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2015;104(5):449–57.
5. Schoemaker AA, Sprickelman AB, Grimshaw KE, Roberts G, Grabenhenrich L, Rosenfeld L, et al. Incidence and natural history of challenge-proven cow's milk allergy in European children - EuroPrevall birth cohort. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2015;70(8):963–72.
6. Martorell-Aragonés A, Echeverría-Zudaire L, Alonso-Lebrero E, Boné-Calvo J, Martín-Muñoz MF, Nevot-Falcó S, et al. Position document: IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergol Immunopathol*. 2015;43(5):507–26.
7. Nowak-Węgrzyn A, Katz Y, Mehr SS, Koletzko S. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(5):1114–24.
8. Berni Canani R, Di Costanzo M, Troncone R. The optimal diagnostic workup for children with suspected food allergy. *Nutrition*. 2011;27(10):983–7.
9. Koletzko S, Heine RG. Non-IgE mediated cow's milk allergy in EuroPrevall. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2015;70(12):1679–80.
10. Boné, J; Claver A; Guallar I, Plaza a M. Allergic proctocolitis, food-induced enterocolitis: immune mechanisms, diagnosis and treatment. *Allergo et Immunopathol*. 2009;37(1):36–42.
11. Ruffner MA, Ruyman K, Barni S, Cianferoni A, Brown-Whitehorn T, Spergel JM. Food protein-induced enterocolitis syndrome: Insights from review of a large referral population. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2013;1(4):343–9.
12. Savilahti E. Food-induced malabsorption syndromes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*.

- 2000;30:S61-6.
13. Connors L, O'Keefe A, Rosenfield L, Kim H. Non-IgE-mediated food hypersensitivity. *Allergy, Asthma Clin Immunol.* 2018;14(2):56.
 14. Nowak-Węgrzyn A. Food protein-induced enterocolitis syndrome and allergic proctocolitis. *Allergy Asthma Proc.* 2015;36(3):172–84.
 15. Espín Jaime B. Manifestaciones digestivas de la alergia alimentaria. *AEPap Curso Actual Pediatría.* 2017;89–98.
 16. Liacouras CA. Food protein-induced allergic proctocolitis of infancy. *UpToDate.* 2008;1–13.
 17. Manuyakorn W, Tanpowpong P. Cow milk protein allergy and other common food allergies and intolerances. *Paediatr Int Child Health.* 2018;9047:1–9.
 18. Biermé P, Nowak-Węgrzyn A, Caubet JC. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies. *Curr Opin Pediatr.* 2017;29(6):697–703.
 19. Heine RG. Pediatric allergy and Allergic gastrointestinal motility disorders in infancy and early childhood. *Pediatr Allergy Immunol.* 2008;19:383–91.
 20. Benninga MA, Nurko S, Faure C, Hyman PE, St James Roberts I, Schechter NL. Childhood functional gastrointestinal disorders: Neonate/toddler. *Gastroenterology.* 2016;150(6):1443–1455e2.
 21. Nurko S, Benninga M, Faure C, Hyman P, Schechter N, Roberts I. Childhood Functional Gastrointestinal Disorders, Neonate/Toddler. *Gastroenterology.* 2016;150:1443–55.
 22. Vandenplas Y, Dupont C, Eigenmann P, Host A, Kuitunen M, Ribes-Koninckx C, et al. A workshop report on the development of the Cow's Milk-related Symptom Score awareness tool for young children. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2015;104(4):334–9.
 23. Vandenplas Y, Steenhout P, Grathwohl D. A pilot study on the application of a symptom-based score for the diagnosis of cow's milk protein allergy. *SAGE Open Med.* 2014;2:205031211452342.
 24. Vandenplas Y, Mukherjee R, Dupont C, Eigenmann P, Høst A, Kuitunen M, et al. Protocol for the validation of sensitivity and specificity of the Cow's Milk-related Symptom Score (CoMiSS) against open food challenge in a single-blinded, prospective, multicentre trial in infants. *BMJ Open.* 2018;8(5):e019968.

25. Koletzko S, Niggemann B, Arato A, Dias J a., Heuschkel R, Husby S, et al. Diagnostic Approach and Management of Cow's-Milk Protein Allergy in Infants and Children: ESPGHAN GI Committee practical guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;55(2):221–9.
26. Arvola T. Rectal Bleeding in Infancy: Clinical, Allergological, and Microbiological Examination. *Pediatrics.* 2006;117(4):e760–8.
27. Xanthakos SA¹, Schwimmer JB, Melin-Aldana H, Rothenberg ME, Witte DP CM. Prevalence and outcome of allergic colitis in healthy infants with rectal bleeding: a prospective cohort study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;41(1):16–22.
28. Lake AM, Whittington PF, Hamilton SR. Dietary protein-induced colitis in breast-fed infants. 1982;101(6):906–10.
29. Monti G, Castagno E, Liguori SA, Lupica MM, Tarasco V, Viola S, et al. Food protein–induced enterocolitis syndrome by cow's milk proteins passed through breast milk. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):679–80.
30. Plaza-Martín AM. Alergia a proteínas de la leche de vaca. *Protocolo Asociación Española de Pediatría.* 2013;51–61.
31. Atanaskovic-markovic M. Refractory Proctocolitis in the Exclusively Breast-Fed Infants. *Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets.* 2014;14:63–6.
32. Boyce, JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;126(6):1105–18.
33. Luyt D, Ball H, Makwana N, Green MR, Bravin K, Nasser SM, et al. BSACI guideline for the diagnosis and management of cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(5):642–72.
34. Nice. Diagnosis and assessment of food allergy in children and young people in primary care and community settings. Clinical guideline. *Natl Inst Heal Care Exp NICE Guidel.* 2011;116.
35. Venter C, Brown T, Shah N, Walsh J, Fox AT. Diagnosis and management of non-IgE-mediated cow's milk allergy in infancy - a UK primary care practical guide. *Clin Transl Allergy.* 2013;3(1):1–11.
36. Venter C, Brown T, Meyer R, Walsh J, Shah N, Nowak-Węgrzyn A, et al. Better recognition, diagnosis and management of non-IgE-mediated cow's milk allergy in

- infancy: IMAP - An international interpretation of the MAP (Milk Allergy in Primary Care) guideline. *Clin Transl Allergy*. 2017;7(1):1–9.
37. Nowak-Węgrzyn A, Chehade M, Groetch ME, Spergel JM, Wood RA, Allen K, et al. International consensus guidelines for the diagnosis and management of food protein–induced enterocolitis syndrome: Executive summary—Workgroup Report of the Adverse Reactions to Foods Committee, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(4):1111–1126.e4.
 38. Espín Jaime B, Díaz Martín JJ, Blesa Baviera LC, Claver Monzón Á, Hernández Hernández A, García Burriel JI, et al. Non-IgE-mediated cow's milk allergy: Consensus document of the Spanish Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (SEGHNP), the Spanish Association of Paediatric Primary Care (AEPAP), the Spanish Society of Extra-hospital Paediatric. *An Pediatr*. 2019;in press:S1695-4033(18)30530-7.
 39. Gonzaga TA, Alves FA, Cheik MFA, de Barros CP, Rezende ERMA, Segundo GRS. Low efficacy of atopy patch test in predicting tolerance development in non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergol Immunopathol*. 2018;46(3):241–6.
 40. Vandenas Y. Prevention and management of cow's milk allergy in non-exclusively breastfed infants. *Nutrients*. 2017;9(7):1–15.
 41. American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. Hypoallergenic infant formulae. *Pediatrics*. 2000;106:346–9.
 42. Lucarelli S, Nardo GD, Lastrucci G, D'Alfonso Y, Marcheggiano A, Federici T, et al. Allergic proctocolitis refractory to maternal hypoallergenic diet in exclusively breast-fed infants: A clinical observation. *BMC Gastroenterol*. 2011;11(1):82.
 43. Borschel MW, Antonson DL, Murray ND, Oliva-Hemker M, Mattis LE, Baggs GE. Evaluation of a free amino acid-based formula in infants with presumptive food protein-induced proctocolitis. *SAGE Open Med*. 2014;2(0):0–6.
 44. Berni Canani R, Nocerino R, Terrin G, Frediani T, Lucarelli S, Cosenza L, et al. Formula selection for management of children with cow's milk allergy influences the rate of acquisition of tolerance: A prospective multicenter study. *J Pediatr*. 2013;163(3):1–8.
 45. Berni Canani R, Nocerino R, Terrin G, Coruzzo A, Cosenza L, Leone L TR. Effect of *Lactobacillus GG* on tolerance acquisition in infants with cow's milk allergy: A randomized trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(2):580–2.

46. Berni Canani R, Di Costanzo M, Bedogni G, Amoroso A, Cosenza L, Di Scala C, Granata V NR. Extensively hydrolyzed casein formula containing *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces the occurrence of other allergic manifestations in children with cow's milk allergy: 3-year randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(6):1906–1913.e4.
47. Noval Rivas M, Burton OT, Wise P, Zhang YQ, Hobson SA, Garcia Lloret M et al. A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(1):201–12.
48. Wood RA, Sicherer SH, Vickery BP, Jones SM, Liu AH, Fleischer DM et al. The natural history of milk allergy in an observational cohort Robert. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(3):805–12.
49. Maloney J, Nowak-Wegrzyn A. Educational clinical case series for pediatric allergy and immunology: Allergic proctocolitis, food protein-induced enterocolitis syndrome and allergic eosinophilic gastroenteritis with protein-losing gastroenteropathy as manifestations of non-IgE-mediate. *Pediatr Allergy Immunol.* 2007;18(4):360–7.
50. Nardo G Di, Cremon C, Frediani S, Lucarelli S, Villa MP, Stanghellini V, et al. Allergic Proctocolitis Is a Risk Factor for Functional Gastrointestinal. *J Pediatr.* 2018;195:128-133.
51. Katz Y, Goldberg MR, Rajuan N, Cohen A, Leshno M. The prevalence and natural course of food protein-induced enterocolitis syndrome to cow's milk: A large-scale, prospective population-based study. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):647–53.
52. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman SP. Capítulo 1. Propiedades y generalidades de las resupuestas inmunitarias. En: *Inmunología celular y molecular.* 8ª edición. Editorial Elsevier España;2015. p. 1–13.
53. S.Abul K. Abbas, ANDrew H. Lichtman SP. Capítulo 2. Células y tejidos del sistema inmunitario. En: *Inmunología celular y molecular.* 8ª edición. Editorial Elsevier España; 2015. p. 13–35.
54. Lanier LL, Sun JC. Do the terms innate and adaptive immunity create conceptual barriers? *Nat Rev Immunol.* 2009;9(5):302–3.
55. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428–35.
56. Paust S1, Senman B von AU. Adaptive Immune Responses Mediated by Natural Killer Cells. *Immunol Rev.* 2010;235(1):286–96.

57. Timothy E. O'Sullivan, Joseph C. Suna, and LLL. Natural Killer Cell Memory Timothy. *Immunity*. 2015;43(4):634–45.
58. Geary CD SJ. Memory responses of natural killer cells. *Semin Immunol*. 2017;31:11–9.
59. S.Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman SP. Capítulo 9. Activación de los linfocitos T. En: *Inmunología celular y molecular*. 8ª edición. Editorial Elsevier España; 2015. p. 199–212.
60. S.Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman SP. Capítulo 10. Activación y diferenciación de los linfocitos T efectoros CD4+. En: *Inmunología celular y molecular*. 8ª edición. Editorial Elsevier España; 2015. p. 213–30.
61. Noval Rivas M CT. Regulatory T cells in Allergic Diseases Magali. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(3):639–52.
62. Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA. TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(2):247–54.
63. S.Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman SP. Capítulo 12. Activación y diferenciación del linfocito B y producción de anticuerpos. En: *Inmunología celular y molecular*. 2015. 8ª edición. Editorial Elsevier España; p. 239–64.
64. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity*. 2015;42(4):607–12.
65. van de Veen W, Stanic B, Wirz OF, Jansen K, Globinska A, Akdis M. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(3):654–65.
66. Correa-Rocha R, Pérez A, Lorente R, Ferrando-Martínez S, Leal M, Gurbindo D, et al. Preterm neonates show marked leukopenia and lymphopenia that are associated with increased regulatory T-cell values and diminished IL-7. *Pediatr Res*. 2012;71(5):590–7.
67. Smith M, Tourigny MR, Noakes P, Thornton C a, Tulic MK, Prescott SL. Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4(+)CD25(+)CD127(lo/-) regulatory T cell function. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:1460–6, 1466.e1-7.
68. Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Berti E, Adorini L, et al. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4 + Foxp3 + regulatory T cells by Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4 + Foxp3 +

- regulatory T cell. *Blood*. 2009;106(10):3490–7.
69. Van Belle TL, Vanherwegen A-S, Feyaerts D, De Clercq P, Verstuyf A, Korf H, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and its analog TX527 promote a stable regulatory T cell phenotype in T cells from type 1 diabetes patients. *PLoS One*. 2014;9(10):e109194.
 70. Muehleisen B, Gallo RL. Vitamin D in allergic disease: Shedding light on a complex problem. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(2):324–9.
 71. Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol*. 2012;76(3):315–25.
 72. Olliver M, Spelmink L, Hiew J, Meyer-Hoffert U, Henriques-Normark B, Bergman P. Immunomodulatory effects of vitamin D on innate and adaptive immune responses to *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 2013;208(9):1474–81.
 73. S.Abul K. Abbas, ANDrew H. Lichtman SP. Capitulo 20. Alergia. En: *Inmunología celular y molecular*. 8ª edición. Editorial Elsevier España; 2015. p. 417–36.
 74. Turcanu V, Brough HA, Du Toit G, Foong RX, Marrs T, Santos AF et al. Immune mechanisms of food allergy and its prevention by early intervention. *Curr Opin Immunol*. 2017;48:92–8.
 75. Yu W, Freeland DMH, Nadeau KC. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(12):751–65.
 76. Tan-Lim CSC, Esteban-Ipac NAR. Probiotics as treatment for food allergies among pediatric patients: a meta-analysis. *World Allergy Organ J*. 2018;11(1):1–13.
 77. Noval Rivas M, Burton OT, Wise P, Charbonnier LM, Georgiev P, Oettgen HC et al. Regulatory T cell reprogramming towards a Th2 cell-like lineage impairs oral tolerance and promotes food allergy. *Imm*. 2015;42(3):512–23.
 78. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*. 2007;13(3):108–16.
 79. Palomares O, Martín-Fontecha M, Lauener R, Traidl-Hoffmann C, Cavkaytar O, Akdis M, et al. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: Roles of IL-10 and TGF- β . *Genes Immun*. 2014;15(8):511–20.
 80. Mohr A, Malhotra R, Mayer G, Gorochov G, Miyara M. Human FOXP3+ T regulatory cell heterogeneity. *Clin Transl Immunol*. 2018;7(1):1–11.
 81. Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3+ CD4+ regulatory T cells: Their knowns and

- unknowns. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(3):346–51.
82. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775–87.
 83. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler D a. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490–500.
 84. Begin P, Chinthrajah RS NK. Oral immunotherapy for the treatment of food allergy. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10:2295–302.
 85. Perezábad L, Reche M, Valbuena T, López-Fandiño R, Molina E, López-Expósito I. Oral food desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy: Immunological changes underlying desensitization. *Allergy, Asthma Immunol Res.* 2017;9(1):35–42.
 86. Miyara M, Wing K, Sakaguchi S. Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+regulatory T-cell activation and expansion. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(4):749–55.
 87. Niya Wanich, MD, Anna Nowak-Wegrzyn, MD, Hugh A. Sampson, MD and WG, Shreffler, MD P. Allergen-Specific Basophil Activation Associated with Clinical Tolerance in Patients with Milk Allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(4):789–94.
 88. Shreffler WG, Wanich N, Moloney M, Nowak-Wegrzyn A, Sampson H a. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(1):43–52.e7.
 89. Fuentes-Aparicio V, Alonso-Lebrero E, Zapatero L, Infante S, Lorente R, Ángeles Muñoz-Fernández M, et al. 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. Correa-Rocha R, Muñoz MA. Values of T cell populations including Treg in Pre-Term and full-Term healthy neonates. En: *Advances in Medicine and Biology.* Ed Berhardt LV. Nova Science Publishers, 2011. p. 227–41.
 91. Fuentes-Aparicio V, Alonso-Lebrero E, Zapatero L, Infante S, Lorente R, Muñoz-Fernández MÁ, et al. Induction of Treg cells after oral immunotherapy in hen's egg-allergic children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2014;25(1):103–6.
 92. Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol.* 2003;15(6):627–33.

93. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Mechanisms of disease Relation of CD4 + CD25 + regulatory T-cell suppression of allergen- driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. 2004;608–15.
94. Akdis M. Immune Responses in Healthy and Allergic Individuals Are Characterized by a Fine Balance between Allergen-specific T Regulatory 1 and T Helper 2 Cells. *J Exp Med*. 2004;199(11):1567–75.
95. Burks AW, Calderon MA, Casale T, Cox L, Demoly P, Jutel M, et al. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(5):1288–1296.e3.
96. Adel-Patient K, Wavrin S, Bernard H, Meziti N, Ah-Leung S, Wal JM. Oral tolerance and Treg cells are induced in BALB/c mice after gavage with bovine beta-lactoglobulin. *Allergy*. 2011;66(10):1312–21.
97. Eigenmann PA. Mechanisms of food allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009;20:5–11.
98. Barrios López M, García Rebolgar C, Medina Benítez E. Proctocolitis hemorrágica en lactante exclusivamente alimentado al pecho. *Acta Pediatr Esp*. 2007;65(7):341–5.
99. Chung HL, Hwang B, Park J, Gyung S. Expression of transforming growth factor β 1 , transforming growth factor type I and II receptors , and TNF- α in the mucosa of the small intestine in infants with food protein – induced enterocolitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;106(1):150–4.
100. Sekerkova A, Fuchs M, Cecrdlova E, Svachova V, Kralova Lesna I, Striz I, et al. High prevalence of neutrophil cytoplasmic autoantibodies in infants with food protein-induced proctitis/proctocolitis: Autoimmunity involvement? *J Immunol Res*. 2015;2015.
101. Cseh A, Molnár K, Pintér P, Szalay B, Szebeni B, Treszl A, et al. Regulatory T cells and T helper subsets in breast-fed infants with hematochezia caused by allergic colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51(5):675–7.
102. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(1):41–58.

103. Wang KY, Lee J, Cianferoni A, Ruffner MA, Dean A, Molleston JM, et al. Food Protein–Induced Enterocolitis Syndrome Food Challenges: Experience from a Large Referral Center. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;1–7.
104. Fiocchi A, Schunemann H, Ansotegui I, Assa'Ad A, Bahna S, Canani RB, et al. The global impact of the DRACMA guidelines cow's milk allergy clinical practice. *World Allergy Organ J.* 2018;11(1):1–7.
105. Greenhawt M, Bird JA, Nowak-Węgrzyn AH. Trends in Provider Management of Patients with Food Protein–Induced Enterocolitis Syndrome. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5(5):1319–1324.e12.
106. Boronat AC, Ferreira-Maia AP, Matijasevich A, Wang YP. Epidemiology of functional gastrointestinal disorders in children and adolescents: A systematic review. *World J Gastroenterol.* 2017;23(21):3915–27.
107. Elizur A, Cohen M, Goldberg MR, Rajuan N, Cohen A, Leshno M, et al. Cow's milk associated rectal bleeding: A population based prospective study. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012;23(8):766–70.
108. Kaya A, Toyran M, Civelek E, Misirlioglu E, Kirsaciloglu C, Kocabas CN. Characteristics and Prognosis of Allergic Proctocolitis in Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015;61(1):69–73.
109. Ortigosa L, Alonso JRA, Guajardo C. Colitis alérgica. *An Pediatr Contin.* 2012;10(5):264–72.
110. Nacaroglu HT, Erdem SB, Durgun E, Karaman S, Erdur CB, Karkýner CSU, et al. Markers of inflammation and tolerance development in allergic proctocolitis. *Arch Argent Pediatr.* 2018;116(1):1–6.
111. Caubet JC, Ford LS, Sickles L, Järvinen KM, Sicherer SH, Sampson HA, et al. Clinical features and resolution of food protein-induced enterocolitis syndrome: 10-year experience. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(2):382–9.
112. Caubet JC, Nowak-Węgrzyn A. Current understanding of the immune mechanisms of food protein-induced enterocolitis syndrome. *Expert Rev Clin Immunol.* 2011;7(3):317–27.
113. Goswami R, Blazquez AB, Kosoy R, Berin MC, Sciences G, Core IM. Systemic innate immune activation in food protein–induced enterocolitis syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(6):1885–96.
114. Nowak-Węgrzyn A, Chehade M, Groetch ME, Spergel JM, Wood RA, Allen K, et al.

- International consensus guidelines for the diagnosis and management of food protein-induced enterocolitis syndrome: Executive summary—Workgroup Report of the Adverse Reactions to Foods Committee, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(4):1111–1126.e4.
115. Fogg MI, Brown-Whitehorn TA, Pawlowski NA, Spergel JM. Atopy patch test for the diagnosis of food protein-induced enterocolitis syndrome. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006;17(5):351–5.
 116. Gallego-Valle J, Pérez-Fernández VA, Correa-Rocha R, Pion M. Generation of human breg-like phenotype with regulatory function in vitro with bacteria-derived oligodeoxynucleotides. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1–12.
 117. Kimura M, Ito Y, Shimomura M, Morishita H. Cytokine profile after oral food challenge in infants with food protein-induced enterocolitis syndrome. *Br Hosp Home Overseas*. 2017;66(3):452–7.
 118. Kim EH, Burks W. Immunological basis of food allergy (IgE-mediated, Non-IgE-mediated, and tolerance). *Chem Immunol Allergy*. 2015;101:8–17.
 119. Berin MC. Immunopathophysiology of food protein-induced enterocolitis syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(5):1108–13.
 120. Rosekrans PCM, Meijer CJLM, Cornelisse CJ, van der Wal AM, Lindeman J. Use of morphometry and immunohistochemistry of small intestinal biopsy specimens in the diagnosis of food allergy. *J Clin Pathol*. 1980;33(2):125–30.
 121. Savilahti E. Immunochemical study of the malabsorption syndrome with cow's milk intolerance. *Gut*. 1973;14(6):491–501.
 122. Konstantinou, George N. Bencharitiwong R, Grishin A, Caubet JC, Bardina L, Sicherer SH, Sampson HA N-WA. The role of casein-specific IgA and TGF- β in children with Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome to milk. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014;25(7):651–6.
 123. Shek LPC, Bardina L, Castro R, Sampson HA, Beyer K. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2005;60(7):912–9.
 124. Caubet JC, Bencharitiwong R, Ross A, Sampson HA, Berin MC, Nowak-Węgrzyn A. Humoral and cellular responses to casein in patients with food protein-induced enterocolitis to cow's milk. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(2):572–83.
 125. Dang TD, Allen KJ, J. Martino D, Koplin JJ, Licciardi P V., Tang MLK. Food-allergic

- infants have impaired regulatory T-cell responses following in vivo allergen exposure. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27(1):35–43.
126. Wawrzyniak M, Mahony LO, Akdis M. Role of Regulatory Cells in Oral Tolerance. *Allergy, Asthma Immunol Res.* 2017;9(2):107–15.
 127. Bernaldo de Quiros E, Seoane-Reula E, Alonso-Lebrero E, Pion M, Correa-Rocha R. The role of regulatory T cells in the acquisition of tolerance to food allergens in children. *Allergol Immunopathol.* 2018;46(6):612–8.
 128. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med.* 2004;199(12):1679–88.
 129. Palomares O, Yaman G, Azkur AK, Akkoc T, Akdis M, Akdis CA. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol.* 2010;40(5):1232–40.
 130. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity.* 2009;30(5):626–35.
 131. Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. CD25- T Cells Generate CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells by Peripheral Expansion. *J Immunol.* 2004;173(12):7259–68.
 132. Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille JJ. Adaptive Foxp3+Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Control of Allergic Inflammation. *Immunity.* 2008;29(1):114–26.
 133. Smaldini PL, Delgado MLO, Fossati CA, Docena GH. Orally-induced intestinal CD4+ CD25+ FoxP3+ treg controlled undesired responses towards oral antigens and effectively dampened food allergic reactions. *PLoS One.* 2015;10(10):1–14.
 134. Mori F, Angelucci C, Cianferoni A, Barni S, Indolfi G, Casini A, et al. Increase of natural killer cells in children with liver transplantation-acquired food allergy. *Allergol Immunopathol.* 2018;46(5):447–53.
 135. Belizón CT, Páez EO, Claros AFM, Sánchez IR, González AR, Medialdea RV, et al. Calprotectina fecal como apoyo al diagnóstico en la alergia a las proteínas de leche de vaca no IgE mediada. *An Pediatr.* 2016;84(6):318–23.
 136. Merras-Salmio L, Kolho KL, Pelkonen AS, Kuitunen M, Mäkelä MJ, Savilahti E. Markers of gut mucosal inflammation and cow's milk specific immunoglobulins in non-IgE cow's milk allergy. *Clin Transl Allergy.* 2014;4(1):1–8.
 137. Kosnai I, Kuitunen P, Savilahti E SP. Mast cells and eosinophils in the jejunal

- mucosa of patients with intestinal cow's milk allergy and celiac disease of childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1984;3(3):368–72.
138. Zuo L, Rothenberg ME. Gastrointestinal Eosinophilia. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2007;27(3):443–55.
 139. Rothenberg ME. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(1):11–29.
 140. Wada T, Matsuda Y, Toma T, Koizumi E, Okamoto H, Yachie A. Increased CD69 expression on peripheral eosinophils from patients with food protein-induced enterocolitis syndrome. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;170(3):201–5.
 141. Wada T, Toma T, Muraoka M, Matsuda Y, Yachie A. Elevation of fecal eosinophil-derived neurotoxin in infants with food protein-induced enterocolitis syndrome. *Pediatr Allergy Immunol.* 2014;25(6):617–9.
 142. Kalach N, Kapel N, Waligora-Dupriet AJ, Castelain MC, Cousin MO, Sauvage C, et al. Intestinal permeability and fecal eosinophil-derived neurotoxin are the best diagnosis tools for digestive non-IgE-mediated cow's milk allergy in toddlers. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(2):351–61.
 143. Denzel A, Maus UA, Gomez MR, Moll C, Niedermeier M, Winter C, et al. Basophils enhance immunological memory responses. *Nat Immunol.* 2008;9(7):733–42.
 144. Shreffler WG. Evaluation of basophil activation in food allergy: Present and future applications. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006;6(3):226–33.
 145. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Eur J Allergy Clin Immunol.* 2015;70(11):1393–405.
 146. Xu Y ZC. Research progress in the role of intestinal dendritic cells in food allergy. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2018;34(8):761–6.
 147. Paust S, von Andrian UH. Natural killer cell memory. *Nat Immunol.* 2011;12(6):500–8.
 148. Paust S, Senman B, von Andrian UH. Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunol Rev.* 2010;235(1):286–96.
 149. Jyonouchi S, Smith CL, Saretta F, Abraham V, Ruymann KR M-CP. Invariant natural killer T cells in children with eosinophilic esophagitis. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(1):58–68.

150. Jyonouchi S, Abraham V, Orange JS, Spergel JM, Gober L, Dudek E, Saltzman R, Nichols KE CA. Invariant natural killer T cells from food allergic versus non-allergic children exhibit differential responsiveness to milk-derived sphingomyelin. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(1):102–9.
151. Cianferoni A, Saltzman R, Saretta F, Barni S, Dudek E, Kelleher M, et al. Invariant natural killer cells change after an oral allergy desensitization protocol for cow's milk. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(11):1390–7.
152. Heyman M, Darmon N, Dupont C, Dugas B, Hirribaren A, Blaton M agnès, et al. Mononuclear cells from infants allergic to cow's milk secrete tumor necrosis factor α , altering intestinal function. *Gastroenterology*. 1994;106(6):1514–23.
153. Kapel N, Matarazzo P, Haouchine D, Abiola N, Guérin S, Magne D, et al. Fecal tumor necrosis factor alpha, eosinophil cationic protein and IgE levels in infants with cow's milk allergy and gastrointestinal manifestations. *Clin Chem Lab Med*. 1999;37(1):29–32.
154. Mori F, Barni S, Cianferoni A, Pucci N, De Martino M, Novembre E. Cytokine expression in CD3+ cells in an infant with food protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES): Case report. *Clin Dev Immunol*. 2009;2009:4–7.
155. Noh J, Noh G. Allergen-Specific Responses of CD19^{high} and CD19^{low} B Cells in Non-IgE Mediated Food Allergy of Late Eczematous Reactions in Atopic Dermatitis: Presence of IL-17- and IL-32-Producing Regulatory B Cells (Br17 & Br32). *Inflamm Allergy-Drug Targets*. 2012;11(4):320–9.
156. Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, et al. Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to TH2. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(2):590–2.
157. Dupont C, Bradatan E, Soulaines P, Nocerino R, Berni-Canani R. Tolerance and growth in children with cow's milk allergy fed a thickened extensively hydrolyzed casein-based formula. *BMC Pediatr*. 2016;16(1):1–8.
158. Moreno Villares JM, Oliveros Leal L, Torres Peral R, Luna Paredes C, Martínez-Gimeno A, García-Hernández G. ¿Cómo crecen los lactantes diagnosticados de alergia a proteínas de leche de vaca? *An Pediatr*. 2006;64(3):244–7.
159. Baldassarre ME, Laforgia N, Fanelli M, Laneve A, Grosso R, Lifschitz C. *Lactobacillus GG Improves Recovery in Infants with Blood in the Stools and Presumptive Allergic Colitis Compared with Extensively Hydrolyzed Formula Alone.*

- J Pediatr. 2010;156(3):397–401.
160. Vandenas Y, Steenhout P, Planoudis Y, Grathwohl D. Treating cow's milk protein allergy: A double-blind randomized trial comparing two extensively hydrolysed formulas with probiotics. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2013;102(10):990–8.
 161. Smits HH, Engering A, Kleij D Van Der, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, Kooyk Y Van. Selective probiotic bacteria induce IL-10 – producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell – specific intercellular adhesion molecule 3 – grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(6):1260–7.
 162. Perezabad L, López-Abente J, Alonso-Lebrero E, Seoane E, Pion M C-RR. The establishment of cow's milk protein allergy in infants is related with a deficit of regulatory T cells (Treg) and vitamin D. *Pediatr Res*. 2017;81(5):722–30.
 163. Chambers ES, Hawrylowicz CM. The impact of vitamin D on regulatory T cells. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011;11(1):29–36.
 164. Allen KJ, Koplin JJ, Ponsonby AL, Gurrin LC, Wake M, Vuillermin P, et al. Vitamin D insufficiency is associated with challenge-proven food allergy in infants. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):1109–1116.e6.
 165. Roizen JD, Shah V, Levine MA, Carlow DC. Determination of reference intervals for serum total calcium in the vitamin d-Replete pediatric population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(12):1946–50.
 166. Koulaouzidis A, Sipponen T, Nemeth A, Makins R, Kopylov U, Nadler M, et al. Association Between Fecal Calprotectin Levels and Small-bowel Inflammation Score in Capsule Endoscopy: A Multicenter Retrospective Study. *Dig Dis Sci*. 2016;61(7):2033–40.
 167. Khan S. Testing for fecal calprotectin in food protein–induced enterocolitis syndrome. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2018;28(4):287–8.
 168. Beşer ÖF, Sancak S, Erkan T, Kutlu T, Çokuğraş H, Cokuğraş FÇ. Can fecal calprotectin level be used as a markers of inflammation in the diagnosis and follow-up of cow's milk protein allergy? *Allergy, Asthma Immunol Res*. 2014;6(1):33–8.
 169. Roca M, Varela AR, Donat E, Cano F, Hervas D, Armisen A, et al. Fecal Calprotectin and Eosinophil-derived Neurotoxin in Healthy Children between 0 and 12 Years. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;65(4):394–8.
 170. Jones AP, D'Vaz N, Meldrum S, Palmer DJ, Zhang G, Prescott SL. 25-

- hydroxyvitamin D3 status is associated with developing adaptive and innate immune responses in the first 6 months of life. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(1):220–31.
171. Vijayendra Chary A, Hemalatha R, Seshacharyulu M, Vasudeva Murali M, Jayaprakash D, Dinesh Kumar B. Vitamin D deficiency in pregnant women impairs regulatory T cell function. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;147:48–55.
 172. Chary AV, Hemalatha R, Murali MV, Jayaprakash D, Kumar BD. Association of T-regulatory cells and CD23/CD21 expression with vitamin D in children with asthma. *Ann Allergy, Asthma Immunol*. 2016;116(5):447–54.
 173. Chiu CY, Huang SY, Peng YC, Tsai MH, Hua MC, Yao TC, et al. Maternal vitamin D levels are inversely related to allergic sensitization and atopic diseases in early childhood. *Pediatr Allergy Immunol*. 2015;26(4):337–43.
 174. Díaz M, Guadamuro L, Espinosa-Martos I, Mancabelli L, Jiménez S, Molinos-Norniella C, et al. Microbiota and derived parameters in fecal samples of infants with Non-IgE cow's milk protein allergy under a restricted diet. *Nutrients*. 2018;10(10).
 175. Guest J, Weidlich D, Mascuñan Díaz I, Díaz J, Ferrer-González JP, Gil D, et al. Relative cost-effectiveness of using an extensively hydrolyzed casein formula containing the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in managing infants with cow's milk allergy in Spain. *Clin Outcomes Res*. 2015;7:583–91.
 176. Guest JF, Weidlich D, Kaczmarek M, Jarocka-Cyrta E, Kobelska-Dubiel N, Krauze A, et al. Relative cost-effectiveness of using an extensively hydrolyzed casein formula containing the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in managing infants with cow's milk allergy in Poland. *Clin Outcomes Res*. 2016;8:307–16.
 177. Guest JF, Kobayashi RH, Mehta V, Neidich G. Cost-effectiveness of using an extensively hydrolyzed casein formula containing *Lactobacillus rhamnosus* GG in managing infants with cow's milk allergy in the US. *Curr Med Res Opin*. 2018;34(9):1539–48.



CAPITULO 11: ANEXOS

11.1.- ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO



HOSPITAL MATERNO-INFANTIL

C/MAIQUEZ Nº 9

HOJA DE INFORMACIÓN Y MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: “PAPEL DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS EN LA ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA NO MEDIADA POR IGE EN LA INFANCIA”

Por favor, lea atentamente este documento en el cual le proponemos participar en un estudio con pacientes diagnosticados de proctocolitis alérgica.

El objetivo de este estudio, es encontrar un marcador analítico que nos ayude en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes diagnosticados de proctocolitis alérgica.

Su hijo/a es candidato a participar en este estudio, la decisión sobre la participación de su hijo/a en el estudio, es voluntaria y debe ser tomada libremente. Si decide aceptar, Ud. Podrá retirar su consentimiento en cualquier momento del estudio. La decisión que tome no afectará a la relación con su médico, y seguirá recibiendo el mejor tratamiento posible.

Asimismo, su médico podrá retirarle del estudio en cualquier momento, si considera que es lo más apropiado para el paciente.

Número de visitas y pruebas que se van a realizar

La participación en el estudio solo supondrá la recogida de algunos datos, de forma anónima, relacionados con la patología que presenta su hijo/a.

La participación en el estudio no supone ninguna variación en el tratamiento y recogida de muestras analíticas que se realizan en los niños diagnosticados de proctocolitis alérgica, a los que se realiza estudio analítico en el momento del diagnóstico, tras lo cual se inicia alimentación con una fórmula láctea especial a base de proteínas hidrolizadas, realizándose una última extracción sanguínea en el momento en que se reintroduce la leche completa para ver su tolerancia. Su hijo/a va a ser tratado exactamente igual que si no estuviera participando en el estudio.

Beneficios y riesgos esperados

Su participación en el estudio permitirá un mayor conocimiento sobre los niños que sufren la misma patología que su hijo, la proctocolitis alérgica, lo que nos ayudará en un futuro a realizar un mejor diagnóstico, seguimiento y tratamiento de estos niños.

Se trata de un estudio sin intervención alguna sobre su hijo/a. Éste no va a soportar un riesgo adicional por participar en el estudio ya que su inclusión no conlleva práctica diagnóstica, evaluadora o terapéutica adicional a la que de por sí estime oportuna su médico para el tratamiento de la patología en estudio.

Confidencialidad de los datos

Los datos recogidos en el estudio se introducirán en una base de datos, para realizar el análisis estadístico. Ni su nombre ni el su hijo/a aparecerán en ningún documento del estudio, solo se le asignará un número de paciente al inicio del mismo. En ningún caso se le identificará en las publicaciones o comunicaciones en congresos que puedan realizarse con los resultados de este estudio.

En caso de que le surja cualquier duda, o desee formular cualquier pregunta durante el desarrollo del estudio, póngase en contacto con la persona indicada a continuación

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO “PAPEL DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS EN LA ALERGIA A PROTEINAS DE LECHE DE VACA NO MEDIADA POR IGE EN LA INFANCIA”

Yo, _____ (nombre y apellidos)

en calidad de _____ (relación con el paciente)

del/ la niño/ a _____ (nombre del paciente)

He recibido información acerca del estudio en el que va a participar el paciente.

Estoy satisfecho con la información recibida, he aclarado mis dudas y se que puedo revocar este consentimiento sin que precise dar ninguna razón, y sin que ello suponga un deterioro de la calidad de la asistencia recibida.

De igual modo, declaro haber sido informado de las medidas que serán adoptadas, en aras de garantizar la confidencialidad de cuanta información sobre mi hijo/a o mi representado pudiere recogerse durante el desarrollo del estudio,

Por todo esto, presto mi conformidad con que _____

(nombre y apellidos del paciente) participe en este estudio.

Firma del cuidador: _____ Fecha: _____

Firma del investigado/colaborador _____ Fecha: _____

Según la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, este consentimiento para el tratamiento de sus datos personales y para su cesión es revocable. Por lo tanto, en cualquier momento usted puede ejercer su derecho de acceso, rectificación, oposición y cancelación de sus datos dirigiéndose a: Dra. Jimena Pérez Moreno

En caso de revocación del consentimiento:

Firma del cuidador: _____ Fecha: _____

Firma del investigado/colaborador _____ Fecha: _____

11.2.- ANEXO 2. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS
CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS: ESTUDIO DE CÉLULAS T REGULADORAS
EN LA APLV no IgE mediada

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

PACIENTE (código) :

FECHA NACIMIENTO:

SEXO (1:H; 2:M):

EDAD de inicio de clínica (meses):

FECHA INICIO DE SINTOMATOLOGÍA:

FECHA DX SOSPECHA:

FECHA EXTRACCIÓN ANALÍTICA:FECHA 1º CONSULTA.....

T0 AL DIAGNÓSTICO

CLÍNICA

RECTORRAGIA	no	si
DIARREA	no	si
VÓMITOS	no	si
RECHAZO ALIMENTO	no	si
IRRITABILIDAD	no	si
FIEBRE >38°C CENTRAL	no	si
tºclínica desde ingesta y síntomas (horas)	
tº evolución con cuadro clínico (días)		
Afectación de estado general	no	si
Baja ganancia ponderal	no	si
Palidez	no	si
Edemas	no	si
Exantemas	no	si

SOMATOMETRÍA al dx

Peso kg: percentil DS

Longitud cm: percentil DS

IMC: valor DS

ANTECEDENTES PERSONALES:

Alimentación: LM FA MIXTA

1º Biberón de fórmula adaptada (edad en días):

EMBARAZO (0:controlado y normal; 1:alterado) Si 1: especificar

EDAD GESTACIONAL

PARTO (1:vaginal eutócico; 2:vaginal instrumental;3:cesárea programada; 4: cesárea urgente).5 (otro).....

Eventos hipoxia (ph, asfixia.): 0:no 1:si

Dermatitis atópica 0:no 1:si

Antecedentes familiares de atopia 0:no 1:si

Somatometría neonatal:

PRN kg percentil DS

Longitud cm

percentil

DS

PºNEONATAL (0:NORMAL; 1: INGRESO NEO SIN ATB; INGRESO NEO CON ATB)

PRUEBAS COMPLEMENTARIAS al diagnóstico:

Hemograma	Fecha extracción
Hb /hto	
VCM	
Plaquetas	
Leucocitos totales	
Neutrófilos (%/T)	
Linfocitos (%/T)	
Monolitos (%/T)	
Eosinófilos (%/T)	
Basófilos (%/T)	

bioquímica	Fecha extracción
glucemia	
AST / ALT	
GGT / FAL	
Br T / d / i	
Proteínas/albúmina	
Creat / urea	
PCR (mg/dL)	
Na / P	
Ca / Mg	

Vit D	
-------	--

Gasometría	Fecha extracción
pH	
pCO2	
Bicarbonato	
EB st	
Láctico	

Coagulación	Fecha extracción
INR	
TP	
TTPA	

RAST PLV	Fecha extracción
IgE total	
IgE leche de vaca	
alfalactoalbúmina	
betalactoglobulina	
caseína	

EXTRACCIÓN DE MUESTRAS PARA ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

- A) PACIENTE EN FASE AGUDA T0
- B) PACIENTE EN FASE RESOLUCIÓN T RESOLUCIÓN

Otros:

Cultivo de heces

Inicio TRATAMIENTO FECHA DE INICIO

HIDROLIZADO extenso

CON/SIN PROBIÓTICO

HIDROLIZADO extenso

CON/SIN PROBIÓTICO

+ LM

HIDROLIZADO extenso

CON/SIN PROBIÓTICO

+ LM exenta PLV

LM exenta EXENTA PLV

Hidrolizado de arroz

EVOLUCIÓN CLÍNICA

Tiempo (días) desde inicio tratamiento hasta **RESOLUCIÓN:**

- rectorragia
- irritabilidad/cólico/dolor abd
- rechazo tomas
- vómitos
- otros

Controles	T0	Tres	T1	T2
EDAD (meses)				
Tº tratamiento (meses)				
Clínica: <ul style="list-style-type: none">- rectorragia- irritabilidad/cólico/dolor abd- rechazo tomas- vómitos- otros				

Somatometría				
Peso kg: percentil DS				
Talla cm: percentil DS				
Patología intercurrente				
Plan				

T0: Al dx/1º consulta.

ITO: Inducción tolerancia oral

Fecha /edad (meses) de adquisición de tolerancia oral a PLV:

Tiempo tras tratamiento con HPLV hasta adquisición tolerancia:

11.3.- ANEXO 3. AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA



Hospital General Universitario
Gregorio Marañón
Comunidad de Madrid



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D. Fernando Díaz Otero, Secretario del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**
HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN

CERTIFICA

Que ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

TÍTULO: "Papel de las células T reguladoras en la alergia a proteínas de leche de vaca no mediada por IGE en la infancia"

Promotor: Investigador

y considera que :

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos legalmente establecidos, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Además, el citado CEIC cumple las normas de BPC (CPMP / ICH / 135 / 95).

Este CEIC acepta que dicho estudio sea realizado por el investigador principal:

Dr. Guillermo Álvarez Calatayud / Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Lo que firmo en Madrid, a 29 de mayo de 2012

Fdo.: Dr. Fernando Díaz Otero

61/12

C/ Dr. Esquerdo-46. Pabellón de Gobierno. Planta baja, 28007 Madrid
ceic.hguqm@salud.madrid.org Tel. 91 586 7007 – Fax. 91 400 8156

11.4. ANEXO 4. LICENCIA DE PERMISO PARA LA UTILIZACIÓN DE GRÁFICOS DEL ESTUDIO EUROPREVAL

4/2/2019

RightsLink Printable License

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 04, 2019

This Agreement between AVENIDA CIUDAD DE BARCELONA, 136, 1^oC ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4522030790100
License date	Feb 04, 2019
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Allergy
Licensed Content Title	Incidence and natural history of challenge-proven cow's milk allergy in European children – EuroPrevall birth cohort
Licensed Content Author	A. A. Schoemaker, A. B. Sprikkelman, K. E. Grimshaw, et al
Licensed Content Date	May 18, 2015
Licensed Content Volume	70
Licensed Content Issue	8
Licensed Content Pages	10
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	2
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 2 Adjusted incidence of cow's milk allergy by centre. Figure 3 Age at introduction of cows' milk and development of CMA
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	The role of regulatory T-cell in non-IgE mediated cow`s milk allergy in children
Expected completion date	Feb 2019
Expected size (number of pages)	200
Requestor Location	AVENIDA CIUDAD DE BARCELONA, 136, 1 ^o C AVENIDA CIUDAD DE BARCELONA, 136, 1 ^o C MADRID, MADRID 28007 Spain Attn: AVENIDA CIUDAD DE BARCELONA, 136, 1 ^o C
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

11.5. ANEXO 5. LICENCIA DE PERMISO PARA LA REPRODUCCIÓN DE LA FIGURA 3.



Elsevier España, S.L.U.
C/ Zurbano, 76, 4izq
28010 Madrid, España
Tel: +34 91 402 12 12

A/A Dña. Jimena Pérez Moreno
NIF: 51454596P

Madrid, 26 de febrero de 2019

Estimada Jimena Pérez,

En respuesta a su solicitud de permiso de reproducción del contenido detallado a continuación y perteneciente a la siguiente obra publicada por Elsevier España, S.L.:

Abul K. ABBAS, Andrew H. LICHTMAN, Shiv PILLAI, Inmunología Celular y Molecular, 8ª edición. ISBN: 978-84-9022-894-4. Publicada por Elsevier ©2015.

Capítulo 1 – Propiedades y Generalidades de las Respuestas Inmunitarias.
Figura 1.1- Inmunidades innata y adaptativa.

La editorial autoriza la reproducción de la citada figura en su proyecto de final de grado titulado: *Papel de las células t reguladoras en la alergia a proteínas de leche de vaca no Ig E mediada en la infancia.*

Este permiso se extiende de forma gratuita y restringida al uso descrito y únicamente tiene validez para esta ocasión. En cada copia del trabajo deberán citarse los siguientes datos de la obra original: el título del libro, los autores, las páginas en que se ubican las figuras reproducidas, el año de publicación del libro y el copyright de Elsevier-España, S.L.U.

Atentamente,

Alicia Pérez Díaz
Directora de Contenidos
Elsevier España, S.L.U.