

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Niveles séricos de interleucinas IL-4, IL-5, IL-13 y anticuerpos anti
Toxoplasma gondii y su asociación con sensibilidad alérgica en
preescolares de la ciudad de Hermosillo, Sonora



TESIS
Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Carmen Alfonsina Centeno González

Hermosillo, Sonora

Octubre 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON




**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**




Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN


Los miembros del jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Carmen Alfonsina Centeno González**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



Dra. María Alba Guadalupe Corella Madueño
Director Académico



M.C. Antonio Rascón Careaga
Secretario



Dra. Clara Rosalía Álvarez Chávez
Vocal



Dr. Cosme Alvarado Esquivel
Vocal

Este trabajo se desarrolló como parte del proyecto “Detección temprana de enfermedades alérgicas y su correlación con estado nutricional y parasitosis en una población infantil preescolar de la ciudad de Hermosillo, Sonora, México.” Clave QBOBI1338I. Fue financiado por la Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED). Instituto de Investigación Científica “Dr. Roberto Rivera Damm” y la Universidad de Sonora, Convenio clave: UJED570321HB0. Aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Sonora.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, a la Universidad Juárez del Estado de Durango y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo para llevar a cabo este proyecto.

A mi directora de tesis y a mis sinodales, ya que sin su apoyo y sus consejos este trabajo no hubiera sido posible.

A mis compañeros de proyecto Denia Castro, Julio Lozano, Gerardo Almada y sobre todo a Andrea Romo. A la química Sonia Soufflé por aguantarnos y apoyarnos.

Al Dr. Julián Esparza Romero.

A Obedaid Durazo por su paciencia, por ser mi compañero en todo este trayecto motivándome a seguir hacia adelante; gracias por todas esas tazas con café, por apoyarme siempre y por todo tu tiempo.

DEDICATORIA

A mi padre y a mi abuelo que ya no están.

A mi mami que con sus esfuerzos me ha ayudado a llegar a donde estoy.

A mis tíos y primos.

A los amigos que siempre han estado ahí en las buenas y sobre todo en las malas, a los que ya son familia.

A Obedaid.

Los amo.

“El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. Él no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir, y señalar el camino”

Nikola Tesla

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
OBJETIVOS	x
Objetivo General.....	x
Objetivos Particulares	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Alergia y Factores de Riesgo	3
Mecanismos Inmunitarios de la Alergia	7
IgE y Sensibilización Alérgica.....	15
Participación de Citocinas Derivadas de Linfocitos Th2.....	17
Diagnóstico de Enfermedades Alérgicas	25
Infecciones y Alergia	28
<i>Toxoplasma gondii</i> y alergia.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS	41
Población de Estudio.....	41
Criterios de Inclusión.....	41
Criterios de Exclusión.....	41
Criterios de Eliminación	43
Toma y Procesamiento de las Muestras.....	43
Técnica de Concentración por Sedimentación Ritchie	43
Prueba de Sensibilización	44
Detección de infección por <i>Toxoplasma gondii</i> por ELISA	44
Determinación de Interleucinas	45

Análisis Estadístico.....	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
Población de Estudio.....	47
Estudio Copararasitoscópico	47
Sensibilización Alérgica	49
Valores de Interleucinas.....	50
Prevalencia de anticuerpos IgG anti <i>Toxoplasma gondii</i>	52
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Factores de riesgo de enfermedades alérgicas.....	4
Tabla II	Moléculas liberadas por los mastocitos.....	12
Tabla III	Moléculas liberadas por los eosinófilos.....	14
Tabla IV	Interleucinas relevantes.....	21
Tabla V	Características de la población de estudio.....	48
Tabla VI	Niveles de interleucinas.....	51
Tabla VII	Asociación de los niveles de interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 y sensibilización alérgica.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Interacción de los factores de riesgo.....	8
Figura 2	Mecanismos inmunológicos de la alergia.....	11
Figura 3	Unión de IgE a su receptor FcεRI en células cebadas y estimulación de la producción de IgE.....	16
Figura 4	Función de células T efectoras.....	18
Figura 5	Diferenciación de linfocitos T CD4.....	19
Figura 6	Participación de citocinas en el desarrollo de la enfermedad alérgica.....	22
Figura 7	Prevalencia de <i>T. gondii</i> en México.....	31
Figura 8	Prevalencia de anticuerpos anti <i>T. gondii</i> en población de 1 a 49 años, con diluciones 1:16 y 1:128. México.....	32
Figura 9	Ciclo biológico de <i>T. gondii</i>	34
Figura 10	Respuesta inmune <i>T. gondii</i>	38
Figura 11	Inmunorregulación de la respuesta inmune a alergenosen.....	39
Figura 12	Ubicación de los preescolares seleccionados.....	42

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar los niveles séricos de interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13, anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* y asociación con sensibilización alérgica en preescolares de la ciudad de Hermosillo, Sonora.

Objetivos Particulares

- Buscar la asociación en los niveles séricos de interleucinas IL-4, IL-5, IL-13 y sensibilización alérgica.
- Buscar la asociación de los anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* y sensibilización alérgica.
- Analizar la seroprevalencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* en población infantil de Hermosillo, Sonora.

RESUMEN

Las células Th2 específicas para alérgenos son un componente clave en la enfermedad alérgica mediante la producción de citocinas, como las interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13. Las infecciones gastrointestinales parecen jugar un papel protector en el desarrollo de enfermedades alérgicas debido a una polarización de la respuesta inmune a Th1, en particular las infecciones por *Toxoplasma gondii*. El objetivo de este trabajo es determinar los niveles séricos de interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13, anticuerpos anti *T. gondii* y su asociación con sensibilización alérgica en preescolares de Hermosillo, Sonora. La metodología incluyó un estudio coproparasitoscópico seriado en búsqueda de parásitos intestinales, mediante la técnica de Ritchie. La detección de sensibilización alérgica se realizó en el equipo automatizado ImmunoCAP 100® de Phadia. La determinación cuantitativa de IL-4, IL-5 e IL-13 y la detección de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* se realizó mediante ensayos serológicos por ELISA. Se incluyeron 80 niños con una media de edad de 5 años, 23 con sensibilización alérgica y 57 no sensibilizados, no se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 en individuos sensibilizados y no sensibilizados. No se encontró presencia de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* en la población de estudio. En conclusión: se detectó una prevalencia de sensibilización alérgica del 29%; niveles bajos de interleucinas en los infantes indican que no existe enfermedad alérgica crónica; y el resultado negativo para anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* se relaciona con la baja prevalencia de esta parasitosis en Sonora.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades alérgicas son causadas por una respuesta inmune a antígenos ambientales no patógenos, denominados alergenios, que involucra a células Th2, IgE, mastocitos y eosinófilos. Las alergias se caracterizan porque el primer contacto o fase de sensibilización no suele producir ningún tipo de manifestación clínica, aunque si genera células de memoria y anticuerpos específicos para este alergeno, de tal forma que tras una reexposición al mismo alergeno se producirá la reacción alérgica con sintomatología clínica (Regueiro y col, 2010).

Las enfermedades alérgicas son procesos crónicos que afectan de forma significativa la calidad de vida de los pacientes no solo en el ámbito físico, también en el ámbito emocional, social y psicológico. En niños y jóvenes ocasiona gran ausentismo escolar, y en adultos ausentismo laboral, alteraciones en el descanso nocturno y pérdida de la concentración y por lo tanto una disminución en la producción laboral y rendimiento escolar.

La evolución de la enfermedad alérgica, conocida como marcha alérgica o marcha atópica, comienza con la sensibilización al alergeno hasta la aparición de síntomas clínicos, que van desde eczema a asma. El impacto de las alergias en la infancia es considerable, condicionando gran ausentismo escolar, cambios conductuales y trastornos del aprendizaje (González, 2006). En niños de edad preescolar la rinitis no suele ser el primer síntoma que se produce durante la marcha atópica, sin embargo, la rinitis en pacientes sin asma es un factor de riesgo para el desarrollo de asma tanto en adultos como en niños. En la edad adulta, el desarrollo del asma en pacientes con rinitis suele ser independiente de la alergia, mientras que en la infancia, se asocia con frecuencia a la alergia (Bousquet, 2012). La evolución de una rinitis alérgica hacia asma fluctúa entre 40 y 60% de los casos, siendo aún más probable en aquellos niños con antecedentes familiares de atopia (González, 2006).

Está bien establecido que son diversos los factores que causan el desarrollo de enfermedades alérgicas; los principales factores que se enumeran son la exposición a alérgenos, exposición a contaminación, dieta, predisposición genética y exposición a parásitos, bacterias y virus. Siendo este último relacionado con una baja prevalencia de enfermedades alérgicas, respaldado la hipótesis de que la carga microbiana es un importante factor ambiental que confiere protección en el desarrollo de alergias en la infancia (Hawlader y col, 2014; Seiskari y col, 2007).

Se ha observado que las infecciones gastrointestinales juegan un papel protector en el desarrollo de enfermedades alérgicas, siendo *Toxoplasma gondii* uno de los parásitos asociados a una baja prevalencia de enfermedades alérgicas. Los mecanismos inmunológicos involucrados en este papel protector aún no son claros, se hipotetiza que pudiera deberse en parte por las citocinas Th1, tales como INF- γ e IL-12, producidas durante la infección, llevando a un cambio en el balance de la respuesta Th1/Th2. Por lo tanto es importante evaluar si existe una asociación entre la presencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* y sensibilización alérgica en población infantil de la ciudad de Hermosillo, Sonora, para analizar si este es uno de los factores que está involucrado en el desarrollo de enfermedad alérgica en esta población en particular (Cooper y col, 2014, Fernandes y col, 2010).

ANTECEDENTES

Alergia y Factores de Riesgo

En individuos susceptibles, un número limitado de pequeñas proteínas, denominados alergenios, tienen la capacidad de inducir una patología clínica que se conoce como alergia, enfermedades alérgicas o enfermedades atópicas. Cerca de un 40% de la población occidental muestra una tendencia aumentada para producir IgE ante un amplio número de alergenios (Navarro y col, 2008; González, 2006). Atopia es definida como la alteración genotípica observada que predispone al individuo a padecer manifestaciones inmunológicas anormales mediadas por anticuerpos IgE, a los individuos que presentan dichas alteraciones se les denomina atópicos (Aviña y col., 2006; Singh y col., 2011).

Las alergias son un problema de salud global y afectan a 1 de cada 5 personas en países desarrollados. Dependiendo del sitio de la exposición y el alergenio sensibilizante, los síntomas pueden manifestarse de diferente manera, desde sensibilización asintomática hasta reacciones alérgicas mortales, pasando por un amplio espectro de síntomas respiratorios (rinitis y asma), digestivos y cutáneos (Singh y col., 2011). El ambiente y la variación genética contribuyen casi un 50% de riesgo de enfermedades alérgicas como el asma. (Murphy y col., 2008).

Los antecedentes familiares son muy importantes, numerosos estudios han demostrado que si uno de los padres o un hermano es alérgico, la probabilidad de que el niño padezca alergia es aproximadamente del 50% y, si los dos progenitores son alérgicos, la probabilidad aumenta al 70% (Del Rio Navarro y col., 2009). Se han detectado una serie de genes de susceptibilidad distintivos para las enfermedades alérgicas entre los que se encuentran genes que predisponen a atopia y a hiperreactividad de las vías respiratorias (Tabla I).

Tabla I. Factores de riesgo de enfermedades alérgicas.

Factores del Huésped
<p>Genes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Genes predisponentes a atopia • Genes predisponentes a hiperreactividad de las vías respiratorias • Genes que modulan directamente la respuesta a la exposición medioambiental • Genes que regulan la respuesta inmune • Genes que determinan la respuesta del tejido a la inflamación crónica
Obesidad: Índice de masa corporal (IMC) >30 kg/m ²
Sexo masculino
Factores Ambientales Inhalantes
<p>Alergenos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Intradomiciliarios. Polvo, caspa de animales, cucarachas, mohos, levaduras. • Extradomiciliarios. Pólenes, esporas de hongos
Contaminantes intra o extradomiciliarios
Agentes infecciosos
Humo de cigarro
Factores Ambientales no Inhalantes
Alimentos, consumo de alimentos alérgicos en etapas tempranas de la vida
Dieta

Fuente: modificado de Rutkowski y col, 2014.

También se ha observado que un tipo de variación hereditaria en las respuestas de IgE está vinculado con la región del HLA de clase II (la región del MHC de clase II humana) y afecta a las respuestas de alérgenos específicos, más que a una susceptibilidad general o atopia. La producción de IgE en respuesta a alérgenos concretos está vinculada con determinados alelos de HLA de clase II, lo que implica que combinaciones de péptidos específicos y MHC podrían favorecer una intensa respuesta de las células Th2. Por lo que muchas personas tienen una predisposición general a generar respuestas Th2 y tienen una predisposición específica para responder a algunos alérgenos, más que otras (Rutkowski y col, 2014; Murphy y col, 2008).

Factores ambientales tales como los inviernos más suaves, el efecto invernadero de las ciudades y la contaminación ambiental, favorecen la sensibilización a pólenes. La exposición a alérgenos también contribuye al desarrollo de enfermedades alérgicas dependiendo de la dosis y la exposición en edades tempranas. Por ejemplo los alérgenos extradomiciliarios más comunes son el polen de pastos, los árboles o malezas, cada uno en sus estaciones específicas y entre mayor exposición al polen existe una mayor prevalencia de anticuerpos IgE, hay un aumento en los títulos de IgE y son más severos los síntomas de la enfermedad alérgica (Zubeldía y col, 2012; WHO, 2011).

La exposición a alérgenos extradomiciliarios depende en el número de partículas en el aire, el tiempo que se pasa en el exterior y la eficiencia con la que el ambiente interior es aislado del exterior. Sin embargo la exposición a alérgenos intradomiciliarios como ácaros del polvo, caspa de perro o gato, cucarachas y hongos, también es factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades alérgicas (WHO, 2011).

La rápida urbanización e industrialización ha aumentado la contaminación del aire y la exposición de los individuos a ésta y al mismo tiempo la prevalencia de enfermedades alérgicas ha ido en aumento en países industrializados. Alrededor del mundo, la principal fuente de contaminantes son las emisiones de combustibles de vehículos, construcciones y operaciones agrícolas, plantas de energía e industrias, principalmente refinerías. Un gran número de estudios muestran que niños expuestos a

tráfico vehicular tienen un riesgo mayor de padecer asma y rinitis. Estos efectos son mayores en niños viviendo en áreas metropolitanas (Rutkowski y col, 2014; WHO, 2011).

Debido a que las enfermedades alérgicas son resultado de los efectos de los factores ambientales en individuos genéticamente susceptibles, el cambio climático y la migración tienen un importante impacto en el desarrollo de éstas. El cambio climático afecta la temporalización, distribución, cantidad y calidad de los aeroalergenos y cambia la distribución y severidad de las enfermedades alérgicas. También altera los patrones de clima locales incluyendo las temperaturas mínimas y máximas, precipitación y tormentas, lo cual afecta en el número de enfermedades alérgicas (WHO, 2011).

Inmigración a países con alta prevalencia de enfermedades alérgicas, está asociado a una mayor prevalencia de alergia en inmigrantes, comparado con la prevalencia de atopia en sus países de origen. Estudios en migrantes soportan la noción de que el estilo de vida de países occidentales industrializados y los factores ambientales, facilitan el desarrollo asma y atopia. El efecto es dependiente del tiempo y el desarrollo de la alergia está influenciado por la edad a la que se llevó a cabo la inmigración (WHO, 2011; Ventura y col, 2004).

Cambios en la alimentación son también considerados como factores de riesgo. Un inadecuado consumo de frutas frescas, vegetales verdes y papas, las cuales son principales fuentes de antioxidantes tales como vitamina C, vitamina E, vitamina A, β -carotenos y selenio, han sido asociados con enfermedades alérgicas. Así mismo investigadores observaron que en la segunda mitad del siglo XX en los países desarrollados se produjo un descenso en el consumo de grasas saturadas (mantequilla y manteca de cerdo) y el aumento del consumo de margarina y aceites vegetales ricos en grasas poliinsaturadas omega 6 (Ω -6 AGPI), en particular el ácido linoleico; lo cual estimula la prostaglandina E2, que inhibe $\text{INF-}\gamma$, pero no IL-4, promoviendo de esta manera la producción de IgE. En el Reino Unido, el aumento en el consumo de ácido linoleico precedió al aumento en el asma por varios años. Esta tendencia negativa desde

entonces se ha difundido en todo el mundo debido a la popularidad de restaurantes de comida rápida. La denominada teoría de lípidos sugieren que un aumento en el consumo de alimentos procesados ricos en ácidos grasos poliinsaturados Ω -6 en lugar de alimentos ricos en ácidos grasos poliinsaturados Ω -3 como el atún, salmón, sardinas y el aceite de hígado de bacalao, ha contribuido a un aumento reciente en el asma y la atopia (Rutkowski y col, 2014).

Una disminución en la exposición a microbios patógenos como una posible causa del aumento en la alergia también ha sido objeto de gran atención desde que surgió la idea en 1989. A esto se le conoce como “hipótesis de la higiene”. El postulado es que los ambientes menos higiénicos, en específico los ambientes que predisponen a infecciones en las primeras etapas de la infancia, ayudan a proteger contra enfermedades alérgicas. Esto implica que las respuestas de células Th2 predominan sobre las respuestas de Th1 por omisión en las primeras etapas de la infancia y que el sistema inmunitario es reprogramado para generar más respuestas dominadas por las células Th1 a través de la respuesta de citocinas a las infecciones iniciales (Murphy y col., 2008).

El desarrollo de la enfermedad alérgica no depende de solo uno de estos factores, sino de diversos factores que incluyen una interacción entre los factores de riesgo del agente, es decir del alérgeno, del huésped y del medio ambiente; donde la respuesta del sistema inmune del huésped, patógenos invasores del huésped, diversos factores ambientales y genéticos, son de principal importancia (Figura 1).

Mecanismos Inmunitarios de la Alergia

Las enfermedades por hipersensibilidad representan un grupo de enfermedades heterogéneas desde el punto de vista clínico. Los dos principales factores que determinan las manifestaciones clínicas y patológicas de estas enfermedades son el tipo de respuesta inmunitaria que da lugar a la lesión tisular y la naturaleza y localización del antígeno que es la diana de esta respuesta.

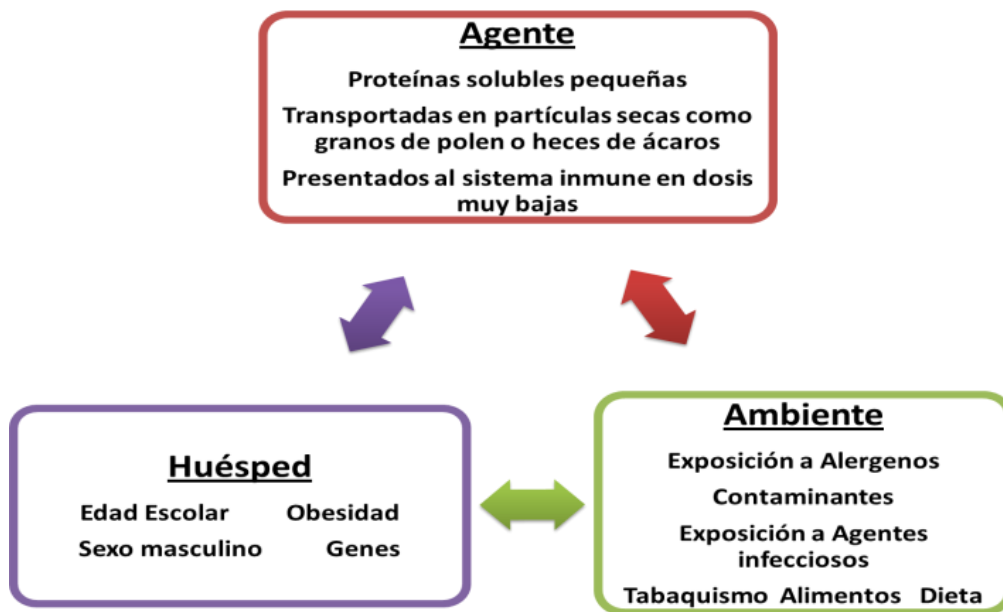


Figura 1. Interacción de los factores de riesgo.

Las enfermedades por hipersensibilidad se clasifican en cuatro tipos:

- Hipersensibilidad de tipo I o hipersensibilidad inmediata. La reacción depende de la producción de IgE en contra de estos alérgenos y la activación de mastocitos y eosinófilos sensibilizados con la IgE reactiva frente a estos alérgenos.
- Hipersensibilidad de tipo II o mediada por anticuerpos. Participan anticuerpos de tipo IgG o IgM. Los anticuerpos activan al complemento y reacciones como fagocitosis y citólisis celular mediada por anticuerpos destruyendo las células que llevan unido un alérgeno.
- Hipersensibilidad de tipo III o por inmunocomplejos. Se forman inmunocomplejos de antígeno (alérgeno) y anticuerpos de tipo IgG o IgM, estos inmunocomplejos al depositarse causan reacciones inflamatorias locales dependientes de Fc (fagocitosis, citólisis celular), activándose también el sistema de complemento y provocando la destrucción de estos complejos. Tarda unas cuantas horas en producir síntomas.
- Hipersensibilidad tipo IV o hipersensibilidad mediada por células. Esta se origina por la respuesta del linfocito T. La lesión tisular se debe a los productos de los macrófagos activados como enzimas hidrolíticas, intermediarios reactivos del oxígeno, óxido nítrico y citocinas pro-inflamatorias (Abbas y col, 2012).

La alergia es el tipo de hipersensibilidad más común y suele equipararse a la hipersensibilidad mediada por IgE. En la mayoría de las alergias, como las que se presentan para alimentos, polen y polvo doméstico, se presentan en virtud de que el individuo se ha sensibilizado a un alérgeno, al producir anticuerpos IgE contra el mismo. En la exposición subsecuente al alérgeno, se desencadena la activación de mastocitos y basófilos, en el tejido expuesto, lo que lleva a una serie de respuestas que son características de la alergia y que se conocen como reacciones alérgicas (Murphy y col., 2008).

En la primera exposición al alérgeno la célula dendrítica presentará al antígeno a la célula T virgen que entonces se diferenciará a un fenotipo Th2, en individuos susceptibles. Las citocinas producidas por los linfocitos diferenciados a un fenotipo Th2 inducirán la activación del linfocito B y el cambio de isotipo de IgM a IgE específica para el alérgeno. Esta IgE específica se une a los mastocitos mediante los receptores de alta afinidad para el Fcε (FcεRI). Esta es la etapa de sensibilización alérgica. En una segunda exposición al alérgeno, este presentará una reacción cruzada con la IgE específica que recubre a mastocitos y estos liberarán mediadores de inflamación de sus gránulos; esta etapa se denomina fase inmediata. En una fase tardía, hay una proliferación de células Th2 con la liberación de citocinas que reclutan eosinófilos y más células Th2 al sitio de exposición (Figura 2) (Abbas y col., 2012; Murphy y col., 2008).

Mastocitos, basófilos y eosinófilos son las células efectoras de las reacciones hipersensibilidad inmediata y enfermedad alérgica. Aunque cada una de estos tipos celulares tienen características únicas, las tres contienen gránulos citoplasmáticos cuyo contenido son los mediadores principales de la reacción alérgica, y las tres producen mediadores lipídicos y citocinas que inducen inflamación (Abbas y col., 2012).

La desgranulación de mastocitos comienza al cabo de algunos segundos y se liberan una serie de mediadores de inflamación, preformados y recién generados (Tabla II) que inducen una cascada inflamatoria importante que es amplificada por el reclutamiento de diversos tipos de células. La histamina es una amina vasoactiva que produce un incremento inmediato del flujo sanguíneo local y permeabilidad vascular. El TNF- α activa las células endoteliales ocasionando una mayor expresión de moléculas de adhesión favoreciendo un mayor flujo de leucocitos inflamatorios y linfocitos hacia los tejidos. Los mastocitos también liberan citocinas como IL-4 e IL-13 que perpetúan la respuesta de las células Th2; los mediadores lipídicos liberados producen la contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular y la secreción de moco, así como la afluencia y activación de leucocitos contribuyendo así a la fase tardía de la respuesta alérgica. Los basófilos también se encuentran en el sitio de reacciones

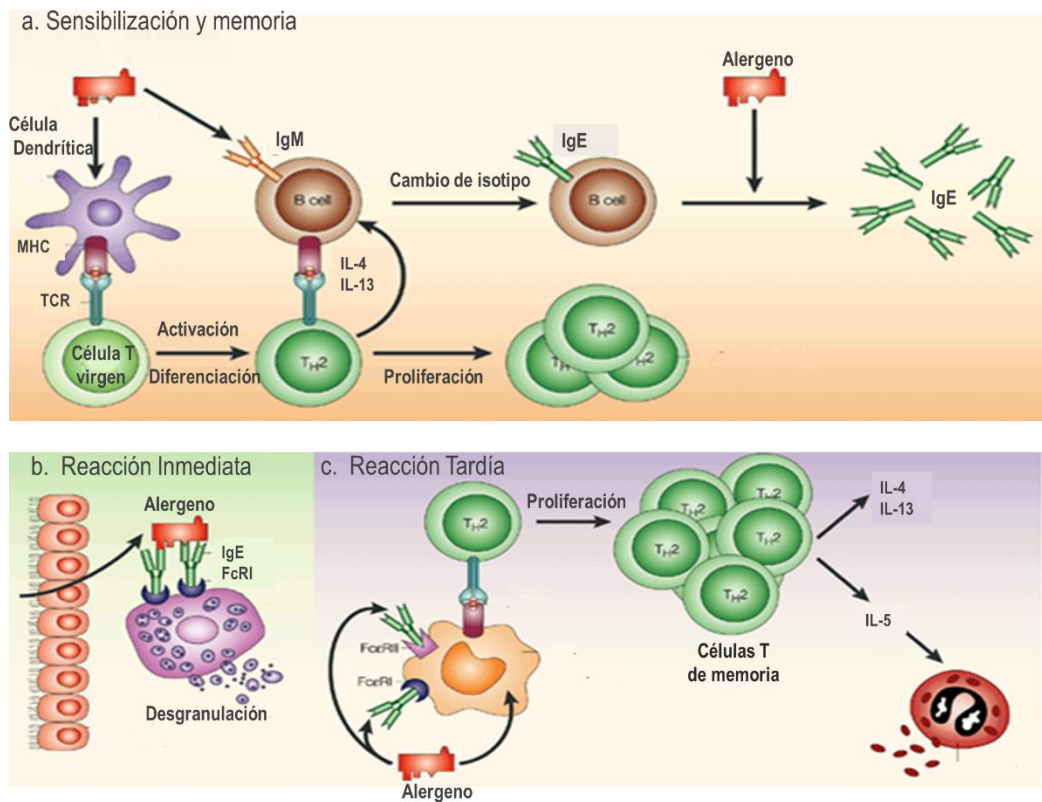


Figura 2. Mecanismos inmunológicos de la alergia.

Fuente: Valenta, 2012.

Tabla II. Moléculas liberadas por los mastocitos.

Clase de producto	Ejemplos	Efectos biológicos
Enzima	Triptasa, quimasa, captesina G, carboxipeptidasa	Remodelación de la matriz de tejido conjuntivo
Mediador tóxico	Histamina, heparina	Tóxico para parásitos Aumento de la permeabilidad vascular Produce contracción del músculo liso
Citocina	IL-4, IL-13	Estimula Y amplifica la respuesta de célula Th2
	IL-3, IL-5, GM-CSF	Favorece la producción y la activación de eosinófilos
	TNF- α	Favorece la inflamación, estimula la producción de citocinas por muchos tipos de células, activa el endotelio
Quimiocina	CCL3	Atrae monocitos, macrófagos y neutrófilos
Mediador lipídico	Prostaglandinas D ₂ , E ₂ Leucotrienos B ₄ , C ₄	Produce contracción del musculo liso Aumenta la permeabilidad vascular Estimula la secreción de moco
	Factor activador de las plaquetas	Atrae leucocitos Amplifica la producción de mediadores lipídicos Activa neutrófilos, eosinófilos y plaquetas

IL, interleucina; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófago;

TNF- α , factor de necrosis tumoral α .

Fuente: Murphy y col, 2008.

alérgicas. Expresan FcεRI en la superficie celular y, tras la activación por citocina o antígeno, liberan histamina de sus gránulos; así mismo producen IL-4 e IL-13.

La desgranulación de los mastocitos y la activación de células Th2 ocasionan la acumulación de una gran cantidad de eosinófilos, los cuales también pueden presentar antígenos a las células T y secretan citocinas Th2. Los eosinófilos secretan de sus gránulos una amplia gama de proteínas y mediadores inflamatorios (Tabla III) entre los que se encuentra la proteína básica mayor, la cual a su vez, produce desgranulación de mastocitos y basófilos. La presencia persistente de eosinófilos es característica de la inflamación alérgica crónica y se considera que contribuye en grado importante a la lesión de los tejidos (Abbas y col., 2012; Murphy y col., 2008).

Determinados antígenos y vías de presentación del antígeno al sistema inmunitario favorecen la producción de IgE y las con ello respuestas alérgicas en sujetos susceptibles. Gran parte de la alergia humana es causada por un número limitado de proteínas pequeñas inhaladas que de manera reproducible desencadenan la producción de IgE en individuos susceptibles. Los síntomas inducidos por estas proteínas pueden ir desde una rinitis alérgica hasta un choque anafiláctico mortal. La mayoría de los alérgenos son proteínas muy solubles relativamente pequeñas que son transportadas en partículas secas como granos de polen o heces de ácaros. Al contacto con la mucosa de las vías respiratorias, por ejemplo, el alérgeno soluble se separa de la partícula y se difunde hacia la mucosa. Los alérgenos típicamente son presentados al sistema inmunitario en dosis muy bajas. No obstante, muchas personas presentan respuestas de anticuerpo IgE impulsadas por Th2 irritantes e incluso potencialmente letales a estas dosis muy bajas de alérgenos. Sin embargo, la sensibilización a cualquier alérgeno solo se lleva a cabo en individuos susceptibles, genéticamente predispuestos a presentar reacciones alérgicas. Se ha observado que proteínas con actividad enzimática son capaces de inducir reacciones alérgicas, y esto se asocia a su capacidad catalítica (Murphy y col., 2008, Navarro y col., 2008).

Tabla III. Moléculas liberadas por los eosinófilos.

Clase de producto	Ejemplos	Efectos biológicos
Enzima	Peroxidasa de eosinófilo	Tóxico para las dianas al catalizar halogenación. Desencadena la liberación de histamina por las células cebadas
	Colagenasa de eosinófilo	Remodela la matriz del tejido conjuntivo
	Metaloproteasa de la matriz-9	Degradación de la proteína de matriz
Proteína toxica	Proteína básica mayor	Tóxico para las células de parásitos y mamíferos. Desencadena la liberación de histamina por las células cebadas
	Proteína catiónica del eosinófilo	Tóxico para los parásitos Neurotoxina
	Neurotoxina derivada del eosinófilo	Neurotoxina
Citocina	IL-3, IL-5, GM-CSF	Amplificación de la producción de eosinófilo por la médula ósea. Producen activación del eosinófilo
	TGF- α , TGF- β	Proliferación epitelial, formación de miofibroblasto
Quimiocina	CXCL8 (IL-8)	Favorece la afluencia de leucocitos
Mediador lipídico	Leucotrienos C4, D4, E4	Producen contracción del musculo liso Aumentan la permeabilidad vascular Aumentan la secreción de moco
	Factor activador de plaquetas	Atrae leucocitos Amplifica la producción de mediadores lipídicos Activa neutrófilos, eosinófilos y plaquetas

IL, interleucina; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófago; TGF, factor de crecimiento transformante.

Fuente: Murphy y col, 2008.

IgE y Sensibilización Alérgica

La sensibilización atópica o sensibilización alérgica se define como la presencia de IgE sérica específica para el alérgeno. La IgE es producida tanto por células plasmáticas en los ganglios linfáticos que drenan el sitio de entrada del antígeno como por las células plasmáticas en el sitio de la reacción alérgica. La IgE difiere de otros isotipos de anticuerpos en que se ubica predominantemente en los tejidos, donde está muy unida a la superficie de las células cebadas a través del receptor FcεRI. La unión del antígeno a IgE produce enlaces cruzados entre estos receptores ocasionando la liberación de mediadores químicos por las células cebadas, lo que puede originar una reacción de hipersensibilidad tipo I. Los basófilos también expresan FcεRI de manera que pueden desplegar IgE unida a su superficie (Figura 3) (Murphy y col., 2008).

Los individuos atópicos producen altos niveles de IgE en respuesta a alérgenos del medio ambiente, mientras que los individuos no atópicos generalmente sintetizan otros isotipos de inmunoglobulinas, tales como IgM e IgG, y sólo pequeñas cantidades de IgE; esta es responsable de la sensibilización de los mastocitos y proporciona el reconocimiento de antígeno para las reacciones de hipersensibilidad inmediata.

La historia natural de la exposición al antígeno es un determinante importante de la cantidad de anticuerpos IgE específicos producidos. La repetida exposición a un antígeno particular es necesaria para el desarrollo de una reacción alérgica a ese antígeno debido al cambio de isotipo a IgE y la sensibilización de mastocitos con IgE debe suceder antes de que ocurra una reacción de hipersensibilidad a un antígeno (Abbas y col., 2012).

La cuantificación de IgE sérica (tanto total, como específica para alérgenos), es un importante elemento de apoyo diagnóstico de alergias. Los niveles de IgE sérica total se encuentran elevados principalmente en dos condiciones: en las alergias (por mecanismos tipo I) y en las parasitosis (especialmente en algunas helmintiasis). También se conocen algunos síndromes que cursan con niveles elevados de IgE, menos

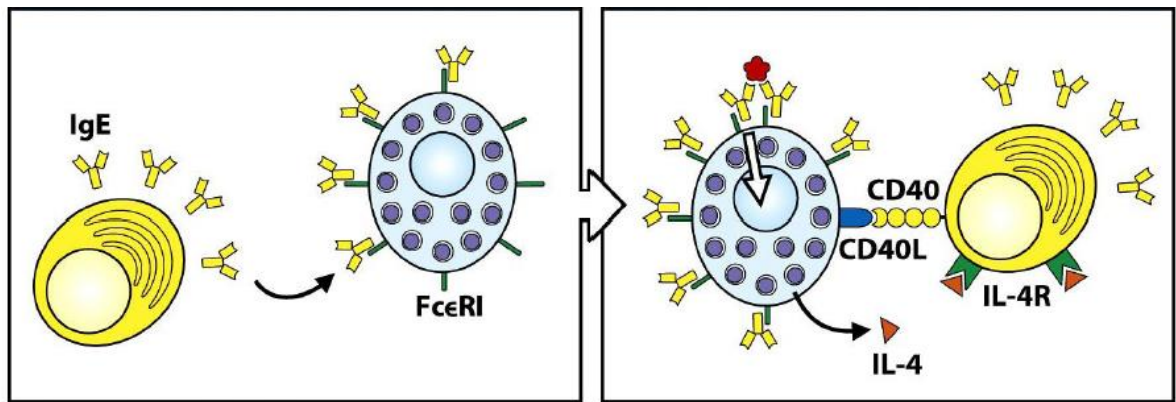


Figura 3. Unión de IgE a su receptor FcεRI en células cebadas y estimulación de la producción de IgE

Fuente: Murphy y col., 2008.

frecuentes en la población (por ejemplo el síndrome de Job o síndrome de hiper-IgE). Esto hace que la cuantificación de la IgE total sea menos informativa para orientar el diagnóstico de alergia, en comparación con la detección y cuantificación de anticuerpos IgE específicos para determinados antígenos (alergenos). Sin embargo, ambas determinaciones son de utilidad. Un bajo nivel de IgE sérica en un adulto (ej. <20 U/ml) sugiere fuertemente descartar un trastorno alérgico. Un alto nivel (ej. >200 U/ml), en aparente ausencia de parasitosis, sugiere una alta probabilidad de alergia. Por otro lado, la detección de anticuerpos IgE contra alergenos particulares es de gran utilidad para el diagnóstico y, por ende, para el establecimiento de un tratamiento farmacológico apropiado (Lomonte, 2009).

Participación de Citocinas Derivadas de Linfocitos Th2

Las células T se diferencian en varios subgrupos de células efectoras totalmente distintas. Primeramente se dividen en células T CD8 positivo y células T CD4 positivo. Las células T CD8 se diferencian todas en células T CD8 citotóxicas, que destruyen sus células blanco y son importantes en la defensa contra patógenos intracelulares. Por otro lado las células T CD4 se pueden diferenciar en cuatro tipos de células T CD4 efectoras: Th1, Th2, Th17 y células T reguladoras. En la Figura 4 se resumen sus funciones.

Dependiendo del estímulo que la célula T reciba por la célula presentadora de antígeno, es el tipo de función que adquirirá la célula T indiferenciada. Los primero tres subgrupos se definen con base a las citocinas que secretan. En el caso del desarrollo de la célula Th1, la señal que aporta la célula presentadora de antígeno comprende las citocinas IFN- γ e IL-12; las células Th2 se desarrollan debido al estímulo proporcionado por la IL-4; células T indiferenciadas se comprometen a la estirpe Th17 debido al estímulo de IL-6 y del factor estimulante de crecimiento (TGF) β , en ausencia de IL-4 e IL-12; en tanto que el estímulo dado por TGF β en ausencia de IL-6, IL-4 e IL-12 lleva al desarrollo de células T reguladoras (Figura 5) (Murphy y col., 2008).

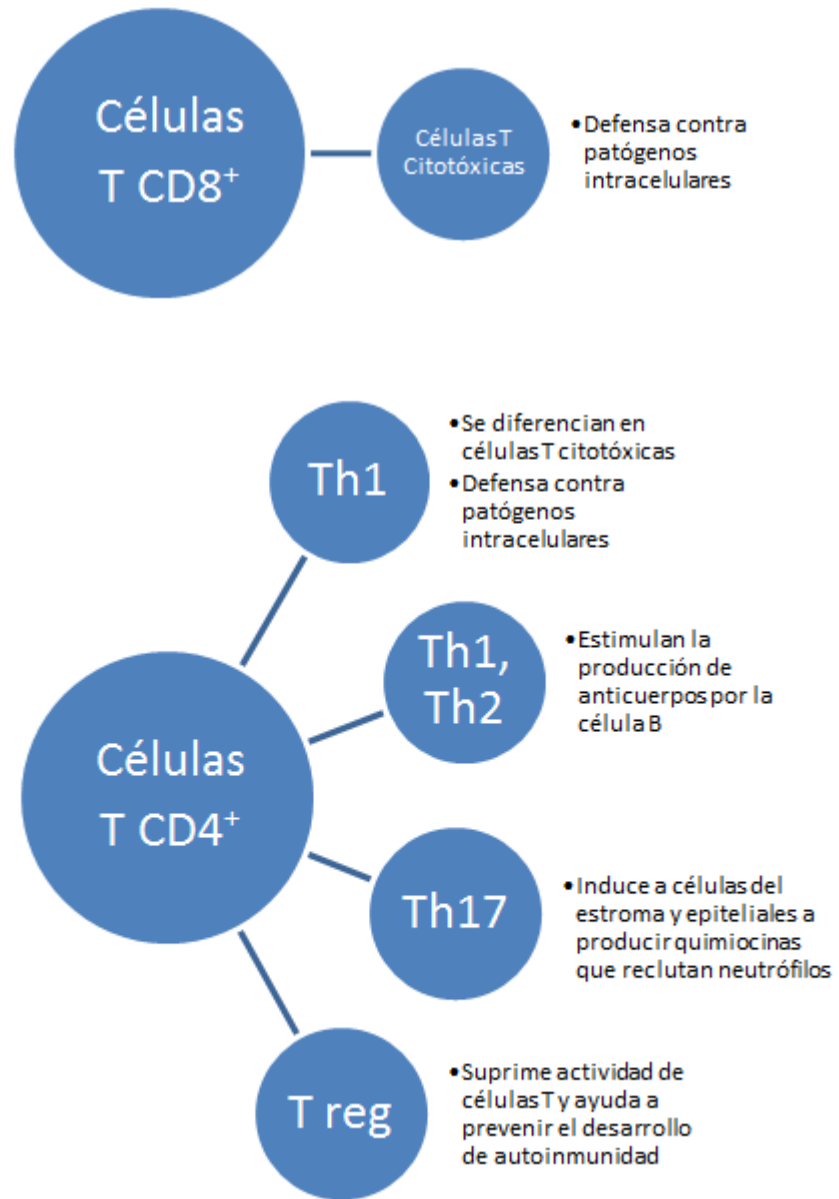


Figura 4. Función de células T efectoras

Fuente: Murphy y col, 2008.

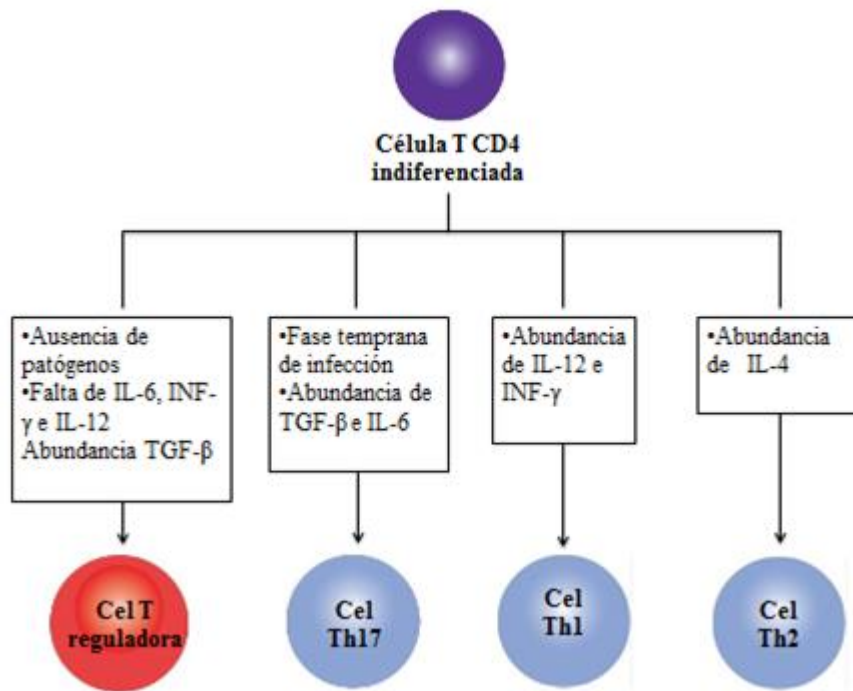


Figura 5. Diferenciación de linfocitos T CD4

Fuente: Murphy y col, 2008.

Las citocinas constituyen un grupo diverso de inmunomoduladores, moléculas de señalización con un amplio rango de funciones, dirigiendo la respuesta del huésped a la infección y al trauma como se resumen en la tabla I. En un principio se identificó que eran originadas por linfocitos, sin embargo ahora se sabe que también son producidas por un amplio rango de tipos celulares, incluyendo proveniente de tejidos inmunes, estructurales y específicos de órgano (Tabla IV). (Scadding, 2014).

Las células Th2 específicas para alérgenos son un componente clave en la enfermedad alérgica y las citocinas que liberan juegan un papel crítico en el desarrollo de la enfermedad alérgica. Mediante la producción de IL-4 las células Th2 regulan el cambio de clase a IgE por la célula B. Los complejos inmunes de IgE activan a células de la respuesta inmune tales como basófilos y mastocitos, mediante el enlace cruzado de sus receptores Fc de alta afinidad para IgE en la superficie de estas células. Los basófilos y mastocitos activados secretan varios productos, incluidos citocinas, quimiocinas, histamina, heparina, serotonina y proteasas, lo cual resulta en la constricción del músculo liso, incremento de la permeabilidad vascular y el reclutamiento de células inflamatorias. Las células Th2 también pueden migrar al tejido pulmonar o intestinal donde, mediante IL-5 e IL-9, reclutan eosinófilos y mastocitos. Al actuar directamente IL-4, IL-9 e IL-13 sobre células epiteliales e IL-4 y IL-13 en células de músculo liso las células Th2 inducen la producción de moco, metaplasia de células caliciformes e hiperreactividad de las vías respiratorias (Paul y col, 2010).

Es así como IL-4, que es esencial para la producción de IgE; IL-5 que conduce la diferenciación terminal y supervivencia de eosinófilos; e IL-13 que promueve la secreción de moco, la hiperreactividad de las vías respiratorias y la remodelación tisular, son las principales citocinas producidas por las células Th2 involucradas en el desarrollo de la sensibilización alérgica y la patología alérgica (Figura 6) (Williams y col, 2012). Por lo tanto el conocer el comportamiento de los niveles de interleucinas puede ayudar a establecer parámetros de interleucinas que sirvan como herramienta para un diagnóstico temprano y monitoreo de la alergia.

Tabla IV. Interleucinas relevantes.

Interleucina	Célula productora	
IL-1	<ul style="list-style-type: none"> • Monocitos • Células endoteliales • Epitelios y fibroblastos 	<ul style="list-style-type: none"> • Activación de linfocitos T • Inducción de síntesis de prostaglandinas por el endotelio • Proliferación y diferenciación de linfocitos B • Síntesis de GM-CSF e IL-4 por linfocitos T
IL-2	<ul style="list-style-type: none"> • Linfocitos T activados 	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferación y diferenciación de linfocitos T • Activación de células NK • Proliferación de linfocitos B y síntesis de inmunoglobulinas • Estímulo para linfocitos T citotóxicos • Estímulo para fagocitos
IL-3	<ul style="list-style-type: none"> • Linfocitos T, queratinocitos, mastocitos 	<ul style="list-style-type: none"> • Hematopoyesis de células mieloides
IL-4	<ul style="list-style-type: none"> • Linfocitos Th0, Th2 • Mastocitos y basófilos • Linfocitos B 	<ul style="list-style-type: none"> • Diferenciación de linfocitos T a Th2 • Crecimiento y diferenciación de linfocitos B • Inducción de síntesis de IgE • Estímulo de endotelio y fibroblastos
IL-5	<ul style="list-style-type: none"> • Linfocitos T, fibroblastos, endotelio 	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento y diferenciación de eosinófilos • Quimiotaxis y activación de eosinófilos • Proliferación de linfocitos B • Estímulo de secreción de IgA
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • Linfocito T, fibroblastos, endotelio 	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de megacariocitos • Diferenciación de linfocito B a plasmocitos • Síntesis hepática de proteínas de fase aguda
IL-9	<ul style="list-style-type: none"> • Linfocitos Th0, Th2 	<ul style="list-style-type: none"> • Estímulo de mastocitos • Crecimiento de linfocitos T
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> • Linfocitos T, algunos linfocitos B, monocitos, queratinocitos y células dendríticas 	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de la presentación del antígeno por macrófagos • Activación de linfocitos B • Inhibición de la secreción de citocinas proinflamatorias
IL-11	<ul style="list-style-type: none"> • Fibroblastos y estroma de médula ósea 	<ul style="list-style-type: none"> • Sinergia para hematopoyesis • Síntesis de proteínas de fase aguda • Estimulación de los fibroblastos y de la fibrosis
IL-12	<ul style="list-style-type: none"> • Células dendríticas, linfocitos B y macrófagos 	<ul style="list-style-type: none"> • Estimulación de la diferenciación a Th1 • Inducción de la síntesis de ING-gamma • Activación de las células NK
IL-13	<ul style="list-style-type: none"> • Linfocitos T, mastocitos y basófilos 	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de IgG e IgE • Crecimiento y diferenciación de linfocitos B • Inhibición de citocinas proinflamatorias
IL-18	<ul style="list-style-type: none"> • Fagocitos 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la síntesis de INF-gamma sinérgicamente con IL-12

Fuente: Zubeldia y col, 2012.

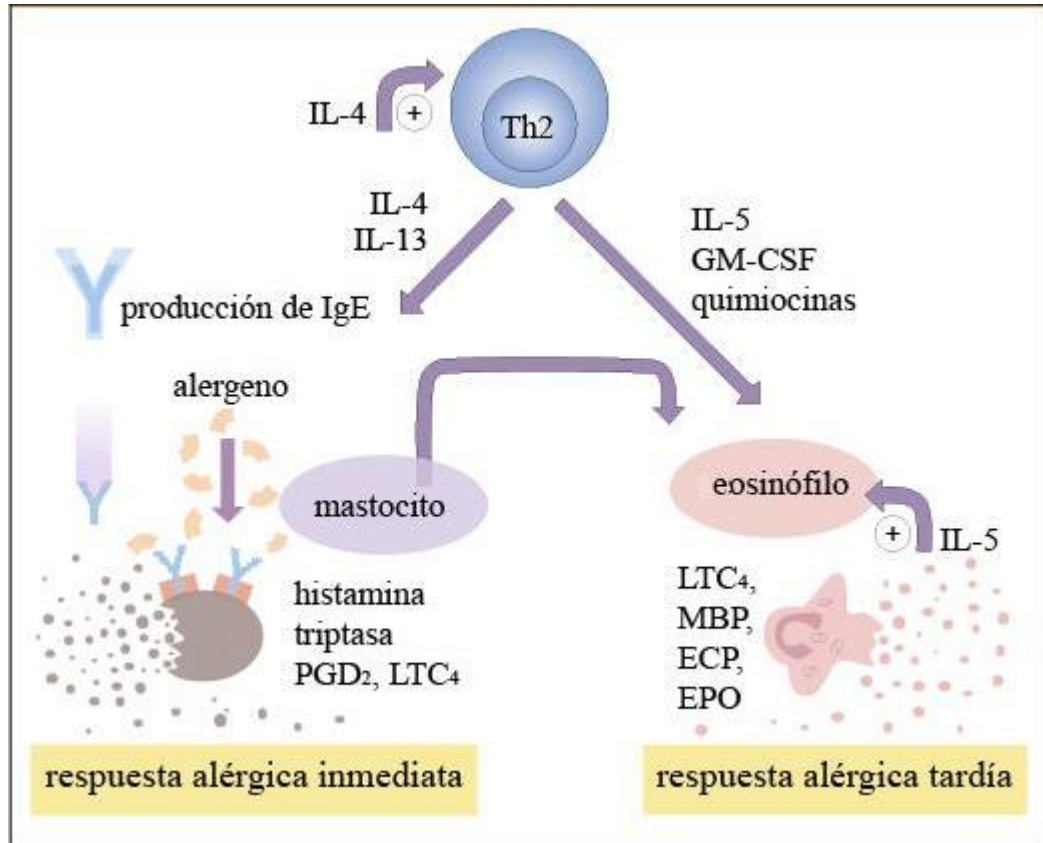


Figura 6. Participación de citocinas en el desarrollo de la enfermedad alérgica
 PGD₂, prostaglandina D₂; LTC₄, leucotrieno C₄; MBP, proteínas básica mayor; ECP, proteína catiónica del eosinófilo; EPO, peroxidasa de eosinófilo; GM-CSF, factor estimulante de colonias granulocito-macrófago.

Fuente: Abbas y col, 2012.

La interleucina 4 (IL-4) es un factor de crecimiento y diferenciación para las células T, en particular para la subpoblación Th2. La IL-4 favorece el desarrollo de células Th2 a partir de células T vírgenes estimuladas por el antígeno, y también funciona como un factor de crecimiento autócrino para las células Th2 diferenciadas favoreciendo la expansión de esta subpoblación. La IL4 activa STAT6 (proteína transductora de señal y activadores de transcripción), que promueve la expresión del factor de transcripción GATA-3 en la célula T, activando los genes que codifican para varias citocinas producidas de manera característica por las células Th2, incluyendo a la IL-4, y también induce su propia expresión, induciendo y manteniendo la diferenciación de Th2 (Abbas y col, 2012; Murphy y col, 2008; Paul y col, 2010).

Las citocinas inducen el cambio de clase de los anticuerpos al estimular la producción de transcripciones de RNA a partir de los sitios de recombinación de cambio que se hallan en posición 5' a cada gen C de cadena pesada. Cuando las células B activadas por antígenos quedan expuestas a IL-4 se lleva a cabo el cambio de isotipo a IgE.

En experimentos con ratones deficientes en IL-4, se ha encontrado que no presentan producción de IgE, además las respuestas de IgE a la estimulación específica *in vitro* de antígeno, así como a la infección por parásitos helmintos *in vivo*, son anuladas por anticuerpos que neutralizan IL-4, mientras que la producción excesiva de IL-4 por las células Th2 está relacionada con la producción elevada de IgE (Murphy y col, 2008; Nakajima y col, 2007). IL-4 estimula la expresión de ciertas moléculas de adhesión, especialmente la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) de las células endoteliales lo que aumenta la unión de linfocitos, monocitos y especialmente eosinófilos. Las concentraciones elevadas de IL-4 inducen reacciones inflamatorias ricas en monocitos y eosinófilos. Además actúa en sinergia con IL-13 en la estimulación de la proliferación de los mastocitos (Nakajima y col., 2007; Deo y col., 2010).

Originalmente interleucina 5 (IL-5) fue definida como una citocina que promueve a las células B activadas para una diferenciación terminal en células

productoras de inmunoglobulinas, esto en sinergia con otras interleucinas como IL-2 e IL-4. La acción principal de IL-5 es estimular el crecimiento y diferenciación de los eosinófilos y activar los eosinófilos maduros. Esta función se complementa con las funciones de IL-4 (cambio a IgE y reclutamiento de eosinófilos) contribuyendo a las reacciones alérgicas (Kips y col., 2001). El rol crítico de IL-5 en eosinofilia ha sido confirmado utilizando anticuerpos anti IL-5 en pacientes asmáticos, en los que casi agota los niveles de eosinófilos circulantes y previene el reclutamiento de eosinófilos en las vías respiratorias; además, estudios con ratones deficientes en IL-5, no presentan eosinofilia pulmonar en respuesta al alérgeno (Sewell y col, 1996; Nakajima, 2007).

IL-13 en las vías respiratorias promueve la supervivencia y la migración de eosinófilos, activación de los macrófagos, aumento de la permeabilidad y la producción de moco por las células epiteliales de vías respiratorias. IL-13 también estimula la hiperreactividad de las vías respiratorias (Ingram y col., 2012). Tanto IL-5 como IL-13 participan en las reacciones de fase tardía, reclutando a otros leucocitos, en los que se encuentran eosinófilo y células Th2, al sitio de inflamación. La reacción de fase tardía y su secuela a largo plazo, la reacción alérgica crónica, contribuye al desarrollo de asma crónica (Murphy y col., 2008).

Existen diversos métodos para la medición de citocinas, siendo la técnica ELISA considerada el método de medición estándar y es ampliamente utilizado en laboratorios clínicos y de investigación biomédica. El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) fue introducido en la década de los setentas, cuando se buscaban marcadores alternativos que reemplazaran los isotopos radiactivos. Esta metodología se basa en el uso de anticuerpos generados contra cada una de las citocinas. Estos métodos de estudio de citocinas proporcionan datos totalmente cuantitativos sobre los cambios en las concentraciones de citocinas y muestran una alta especificidad debido a su uso de anticuerpos monoclonales. Son capaces de distinguir las citocinas que tienen la misma actividad biológica, por ejemplo, IL-1a de IL-1b (Foster, 2001).

En un ELISA tipo sándwich, un anticuerpo está unido a la parte inferior de un pozo que proporciona tanto la captura de antígeno y la especificidad inmunológica, mientras que otro anticuerpo ligado a una enzima proporciona la detección y un factor de amplificación. Este enfoque permite la detección precisa y sensible del antígeno, en este caso, la citocina de interés. Paquetes de ELISA para la medición de citocinas están disponibles comercialmente, por múltiples vendedores. Las ventajas adicionales de ELISA incluyen el hecho de que los resultados son cuantitativos y reproducibles (Leng y col., 2008).

Diagnóstico de Enfermedades Alérgicas

La confirmación de alergia y la identificación de los alérgenos causales son cruciales para el manejo correcto de las enfermedades alérgicas. El diagnóstico preciso permite la aplicación de terapias orientadas a los factores etiológicos de las enfermedades alérgicas, tales como medidas medioambientales e inmunoterapia (WHO, 2011).

La sospecha clínica se confirma por medio de la investigación de anticuerpos IgE *in vivo* (pruebas cutáneas) o *in vitro*. Las pruebas cutáneas deben incluir alérgenos relevantes y uso de extractos alérgicos estandarizados. La prueba *in vitro* es especialmente útil cuando los resultados de la prueba cutánea no se correlacionan con la historia o no pueden realizarse. Las pruebas *in vitro* se pueden aplicar para predecir la probabilidad de enfermedad alérgica (WHO, 2011).

Es posible también medir diferentes marcadores de la activación de células inflamatorias como son, por ejemplo, triptasa o la proteína catiónica del eosinófilo, así como citocinas involucradas en la enfermedad alérgica (Zubeldía y col, 2012). Uno de los métodos más comúnmente usados para el diagnóstico de enfermedades alérgicas mediadas por IgE son las pruebas cutáneas que pueden ser realizadas mediante la prueba de punción cutánea, o intradérmica. Ambos son métodos *in vivo* capaces realizar la detección de anticuerpos IgE específicos para alérgenos. Sin embargo prueba cutánea es la más utilizadas por especialistas debido a que son menos tardadas y sobretodo más

cómodas y seguras para el paciente. Además los resultados que ofrecen las pruebas cutáneas se correlacionan eficazmente con la alergia clínica.

La prueba cutánea resulta en la aparición de una roncha y eritema entre los 10 y 20 minutos de la aplicación del alergen. Se utilizan controles negativo y positivo para realizar la comparación, generalmente solución salina e histamina, como control negativo y positivo respectivamente. La prueba intradérmica es realizada en circunstancias especiales donde un aumento en la sensibilidad es requerida; por ejemplo después de una reacción negativa a la prueba cutánea para vacunas, penicilina, venenos y algunos neumoalergenos (Sicherer y col., 2012; Cantani, 2008).

Las técnicas *in vitro* más comúnmente empleadas para medir los niveles séricos de IgE total incluyen el ensayo de radioinmunoabsorbencia en papel, PRIST por sus siglas en inglés (*paper radioimmunosorbent test*), el cual mide los anticuerpos anti-IgE covalentemente unidos a una fase sólida tal como un disco de papel, donde se añade una dilución apropiada del suero u otro líquido biológico y se incuban. Un complejo de anticuerpos anti-IgE-IgE es formado y mediante la adición de anti-IgE marcado con I¹²⁵ un nuevo complejo de anticuerpos se forma y se mide directamente (Cantani, 2008;).

Un estudio *in vitro* en el cual se identifican anticuerpos IgE específicos para algún alergen en suero es la prueba de radioalergenoabsorbancia (RAST). Este estudio puede ser realizado en pacientes que estén tomando algún medicamento que suprima la reacciones de la pruebas cutáneas, tales como antihistamínicos, además reducen el riesgo de reacciones sistémicas y pueden ser realizados en pacientes con eczema severo que impida la realización de la prueba cutánea (McCormack y col., 2008). En este procedimiento múltiples moléculas del alergen se encuentran unidas de forma covalente a un disco de papel, donde reaccionan con los anticuerpos específicos presentes en la muestra. Se realizan lavados para eliminar los componentes del suero, excepto por la IgE específica unido al alergen. Luego se añaden anticuerpos anti IgE marcados radiactivamente, los cuales se unirán a la IgE específica para alergen. La medición de

la reactividad, mediante un contador gamma, proporcionara la información acerca de la presencia de IgE específica en la muestra de suero (Quiros, 2003).

Dado que las técnicas RAST y PRIST son métodos radioactivos han sido sustituidos por métodos enzimáticos colorimétricos, los cuales son menos costosos y mucho menos riesgosos (Arruda, 2004). Es así como los ensayos inmunoenzimáticos tales como ELISA son ampliamente utilizados para medir IgE total. En esta técnica se utilizan enzimas tales como fosfatasa alcalina y peroxidasa como sistema detector en lugar de un radioisótopo (Cantani, 2008).

El ensayo Phadiatop® es una técnica *in vitro*, cualitativa, que permite detectar en suero la sensibilización mediada por IgE frente a una mezcla de alérgenos. Ante un resultado positivo, en un segundo paso y con la misma muestra de sangre, se cuantifican las IgE específicas alérgeno por alérgeno. Con esta estrategia mejora el coste-beneficio de la determinación de IgE específicas y es posible obtener información objetiva sobre la presencia de sensibilización y en niños con sospecha clínica de enfermedad alérgica puede permitir tomar medidas preventivas para detener el progreso de la marcha alérgica y por consiguiente enfermedades más severas. Si el resultado inicial es negativo, no son necesarias más determinaciones, porque la probabilidad de alergia es muy baja, dado que este método posee una sensibilidad y especificidad nosográfica del 93% y 89%. Si los datos clínicos son discordantes con un resultado negativo, sería necesario cuantificar posteriormente las IgE específicas.

Está basado en un inmunoanálisis en sándwich, en el cual la matriz está compuesta por el 98% de los neumoalérgenos más comunes (ácaros, pólenes, epitelios de perro y gato, hongos) donde es añadido el suero del paciente, seguido de una incubación y lavado, se añade un anticuerpo IgE unido a una enzima. Después de una segunda incubación y lavado, se añade un agente desarrollador de fluorescencia, la respuesta se mide mediante el fluorómetro integrado en el equipo, y los resultados son calculados y reportados. La prueba se realiza utilizando un calibrador 0.35 KU/L de IgE específica como punto de corte. Los resultados son reportados cuantitativamente en

unidades por mililitro usando una curva de calibración de seis puntos (Eriksson, 2009; Mora y col., 2008; Mora y col., 2007; Ballardini y col., 2006; Rose y col, 2002).

Infecciones y Alergia

Se ha reportado una alta prevalencia de enfermedades y sensibilización alérgica en centros urbanos de América Latina, mientras que en las regiones rurales la prevalencia de enfermedades alérgicas es menor. Existen diversos factores ambientales que se han relacionado con este aumento en la prevalencia. Se ha observado que existe una relación inversa entre el número de hermanos y enfermedades alérgicas. También el habitar en zonas rurales y el tener más contacto regular con ganado se ha relacionado con una baja prevalencia de sensibilización y enfermedades alérgicas (Cooper y col., 2014; Seiskari y col., 2007).

La idea de que existía una relación entre las enfermedades alérgica y las infecciones surgió en 1989 cuando David Strachan observó que aquellos niños que tenían un mayor número de hermanos mayores tenían una menor prevalencia de rinitis alérgica y lo relacionó a que el contacto con hermanos mayores transmitía infecciones que prevenían el desarrollo de enfermedades alérgicas. Así mismo observó que cada vez se iba reduciendo más el número de integrantes de las familias y que las conductas de higiene personal iban en aumento lo cual resultaba en el aumento de enfermedades alérgicas. A esta hipótesis se le denominó “hipótesis de la higiene” (Strachan, 2000; Strachan 1989).

Aun no se conoce el porqué de estas asociaciones, sin embargo la “hipótesis de la higiene” postula que los ambientes que predisponen a infecciones en las primeras etapas de la infancia ayudan a proteger contra atopia y asma. Es decir, en ausencia de infecciones donde predominan las respuestas Th1 en la infancia, las respuestas mediadas por Th2 predominan (Murphy y col, 2008).

Atopia y enfermedades alérgicas se han asociado inversamente a la exposición de infecciones orofecales o transmitidas en los alimentos contaminados, tales como las causadas por *Toxoplasma gondii*, virus de hepatitis A y *Helicobacter pylori*, pero no se ha observado ninguna asociación con virus transmitidos por otras rutas como paperas, rubéola, varicela, virus de herpes simple tipo I y citomegalovirus (Matricardi y col, 2000). Las infecciones respiratorias han sido poco estudiadas en este aspecto sin embargo en la información bibliográfica disponible no se observa una asociación entre microorganismos tales como *Streptococcus pneumoniae* y sensibilización alérgica (Ellertsen y col, 2008).

Infecciones por helmintos, tales como *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichuria* también han sido asociadas con una reducida prevalencia de enfermedades alérgicas y se ha observado en estudios en animales infectados por ciertos parásitos inmunoregulan la respuesta a alergenios mediante las células T reguladoras Sin embargo la información sigue siendo inconsistente, mientras que algunas infecciones parasitarias son asociadas con una baja prevalencia de sensibilización alérgica otras han sido asociadas con una mayor prevalencia (Alcántara y col., 2014; Cooper y col., 2014; Maizels y col., 2014).

Datos epidemiológicos han demostrado que infecciones causadas por el virus de Hepatitis A, *Toxoplasma gondii* y *Helicobacter pylori*, así como componentes bacterianos están asociados con riesgo reducido de enfermedades alérgicas. Un estudio realizado en 2007 por Seiskari y colaboradores investigó variaciones y asociaciones en la prevalencia de infecciones microbianas y sensibilización alérgica en niños que vivían en dos áreas geográficas adyacentes pero que diferían marcadamente en el nivel socioeconómico y en los estándares de vida; teniendo así un nivel general de higiene y una exposición general a infecciones y a bacterias comensales, muy diferente en dichas áreas. Analizaron la prevalencia del virus de hepatitis A, *H. pylori* y *T. gondii* y encontraron que su prevalencia fue más alta en la región con un nivel económico más bajo en comparación con el área con un nivel socioeconómico más alto; sin embargo la prevalencia de sensibilización alérgica fue mayor en el área con un nivel socioeconómico alto, en comparación con el área con un nivel socioeconómico más bajo

Lo cual respalda la hipótesis de que la carga microbiana es un importante factor ambiental que confiere protección en el desarrollo de alergias en la infancia (Seiskari y col, 2007).

***Toxoplasma gondii* y alergia**

Varios estudios se han centrado en buscar una asociación en las infecciones por *Toxoplasma gondii* y sensibilización alérgica, y la han asociado con una baja prevalencia de enfermedades alérgicas (Ellertsen y col., 2008; Fenoy y col., 2008; Seiskari y col., 2007). *T. gondii* es un parásito intracelular obligado causante de la toxoplasmosis, en México se encuentra diseminado por todo el país y estudios serológicos han encontrado que un gran porcentaje de adultos poseen anticuerpo anti el parásito, lo que indica que han estado infectados, y aunque no todos enferman si desarrollan una respuesta inmune por lo cual tienen anticuerpos específicos en circulando a lo largo de su vida (Becerril, 2011).

La toxoplasmosis ha sido descrita como una enfermedad ambiental debido a que se ha visto que su transmisión es promovida por falta de saneamiento ambiental, el hacinamiento, la marginación, ciertos hábitos alimenticios y la falta de higiene (Gyan y col., 2015). Se ha reportado que aproximadamente una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada, sin embargo, la incidencia varía entre el 10 y 90% dependiendo el país. Por ejemplo en Francia donde la carne se consume cruda o parcialmente cocida, 80% de la población es seropositiva, mientras que en Inglaterra, donde la carne se consume cocida, solo 29% de la población presenta anticuerpos anti el parásito (Becerril, 2011).

En la República Mexicana la prevalencia poblacional de anticuerpos determinados mediante la técnica de inmunofluorescencia se reportó del 30% en el 2005; la mayor prevalencia anticuerpos anti *T. gondii* en el país se encuentra en las zonas costeras húmedas del Pacífico y del Golfo de México, con un 58%, mientras que la región árida norteña tuvo la prevalencia más baja con un 19% (Figura 7).

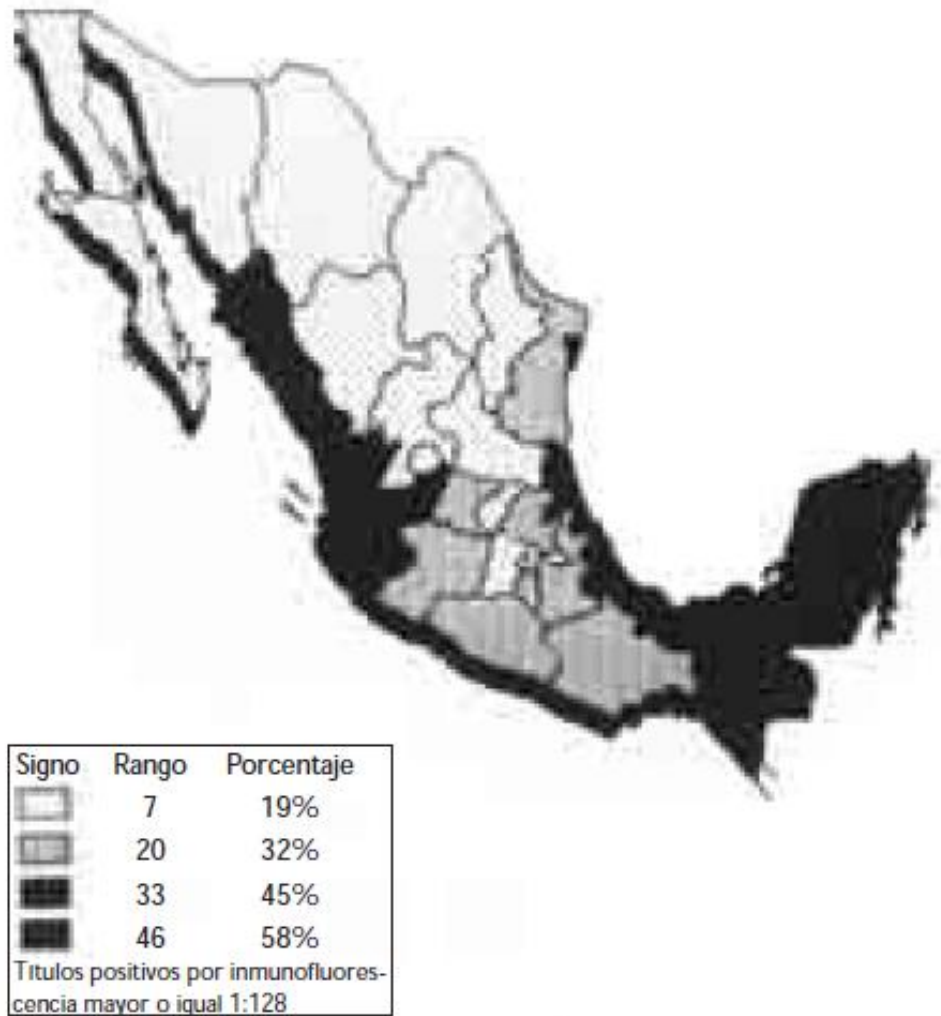


Figura 7. Prevalencia de *T. gondii* en México.

Fuente: Carrada, 2005.

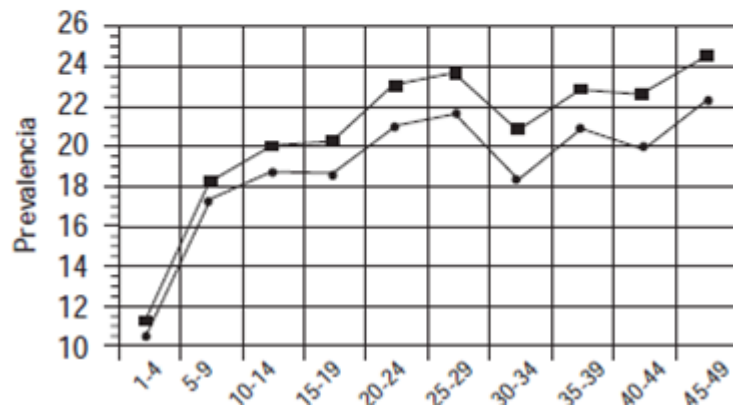


Figura 8. Prevalencia de anticuerpos anti *T. gondii* en población mexicana de 1 a 49 años, con diluciones 1:16 y 1:128.

Fuente: Carrada, 2005.

Con respecto a rangos de edad los niños de entre 1-4 años tuvieron la prevalencia más baja (10-12%), mientras que la población adulta en el rango de edad de 45 y 49 años la prevalencia fue más alta (22-26 %), concluyendo en el estudio realizado que la prevalencia de anticuerpos anti *T. gondii* va aumentando con la edad (Figura 8) (Carrada, 2005).

La infección humana y animal es frecuente pero la enfermedad no lo es. La infección se adquiere por, ingestión de ooquistes que contaminen los alimentos (contaminación fecal) o por quistes presentes en la carne cruda o parcialmente cocida. Los gatos se infectan principalmente por quistes presentes en los tejidos de sus presas (ratones, pájaros), albergan al parásito en el intestino y contaminan los suelos con los ooquistes. Herbívoros y aves que se alimentan en el suelo suelen contagiarse, y la carne cruda de estos animales es infecciosa para carnívoros y omnívoros. También puede suceder en algunos casos de trasplante de órganos o transfusiones sanguíneas, si el órgano proviene de una persona infectada de modo crónico. La transmisión congénita ocurre en el caso de mujeres que contraen la infección durante el embarazo. Los taquizoítos, que se multiplican durante los primeros días de la infección, pueden atravesar la placenta en forma extracelular o intracelular e infectar al feto (Romero, 2007; Carrada, 2005) (Figura 9).

En los individuos inmunocompetentes, la infección por *T. gondii* suele ser asintomático y puede persistir durante toda la vida del huésped sin ninguna complicación. Sin embargo en algunos casos, o en individuos inmunodeficientes o inmunosuprimidos, se observa la toxoplasmosis sintomática. Los síntomas son muy variables e inespecíficos incluyendo fiebre, malestar general, linfadenopatía, miocarditis y encefalitis; todos los cuales son comunes a muchas otras enfermedades infecciosas dificultando el diagnóstico, no es muy frecuente, pero suele suceder en un individuo que no ha tenido experiencia con *T. gondii* y no controle adecuadamente la infección, haciendo que esta sea generalizada, provocando lesiones en cualquier órgano, aparato o sistema (Romero, 2007; Carrada, 2005).

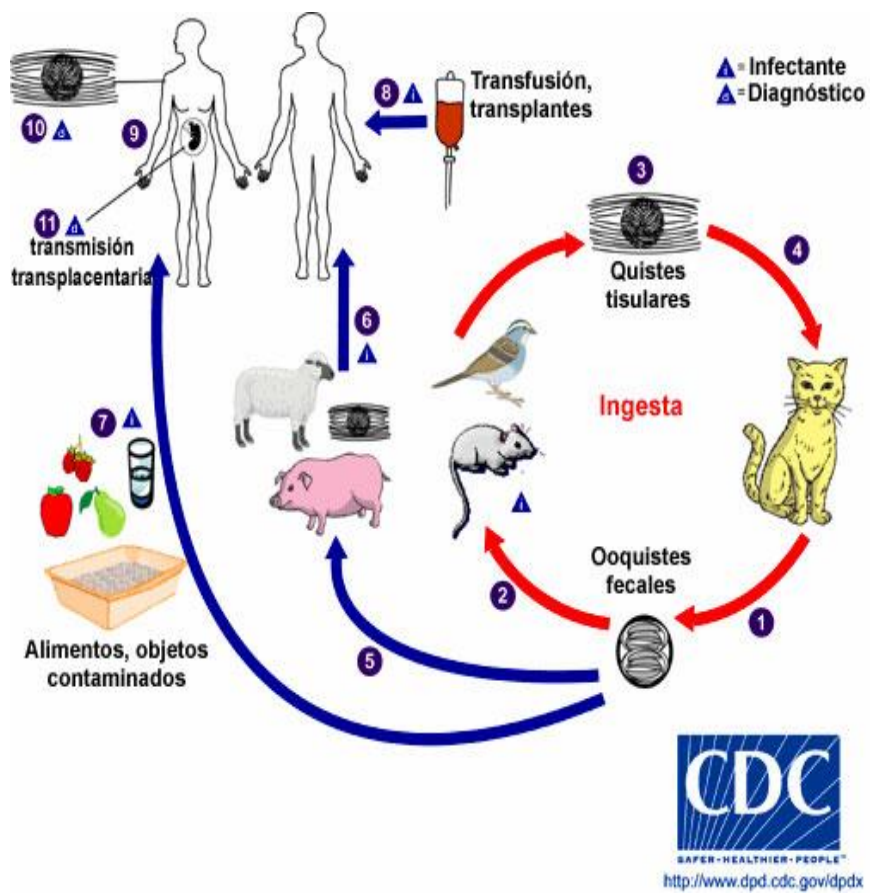


Figura 9. Ciclo biológico de *T. gondii*.

Fuente: CDC, 2013.

En un adulto inmunocompetente la toxoplasmosis ocular puede causar retinitis, coroiditis y uveítis, que puede ocasionar ceguera si no es diagnosticada a tiempo. En los pacientes con respuesta inmune deficiente o suprimida, la toxoplasmosis puede ser grave, son consecuencias fatales, afectando cualquier tejido, pero siendo más habitual en pulmón y sistema nervioso central (Romero, 2007). Las consecuencias de la toxoplasmosis congénita son variables según la etapa del embarazo en la cual se contrae la infección: mientras más temprana la etapa en la que se contrae, más graves son las consecuencias

Durante los primeros meses de embarazo la transmisión del parásito al feto puede provocar un aborto o llevar al nacimiento de niños anormales que presentan una tríada clásica, que asocia una coriorretinitis, calcificaciones intracraneales e hidrocefalia. Mientras, que si la infección se lleva a cabo en los últimos meses del embarazo, los niños son generalmente asintomáticos al nacer, pero pueden presentar secuelas como coriorretinitis, retardo psicomotor y mental, entre otras (Becerril, 2011; Carrada, 2005).

La detección del parásito en si es difícil. Se debe de buscar en tejidos del sistema fagocítico mononuclear, tomando biopsia de ganglios o de otros tejidos; pero en general las biopsias dan un porcentaje muy bajo de diagnóstico. En el caso de toxoplasmosis congénita se puede tomar muestra de sangre de cordón umbilical para observar los taquizoítos. Un recurso útil es la serología con la prueba de Sabin y Feldman. Esta prueba se realiza con el suero de un paciente con probabilidad de tener toxoplasmosis, se le pone en contacto con trofozoítos vivos de *Toxoplasma gondii*, con un colorante y una serie de técnicas que permiten demostrar si hay o no anticuerpos. La prueba de Sabin y Feldman mide anticuerpos dirigidos contra los antígenos de membrana del parásito, y lo que son viables se incuban con el suero a probar en presencia del complemento. Si el suero contiene anticuerpos los parásitos presentan una alteración en el citoplasma y no se tiñen con azul de metileno. El título es considerado como la dilución del suero en la cual el 50% de los parásitos permanecen viables, es una prueba excelente pero peligrosa en su realización en el laboratorio (Becerril, 2011).

Hoy en día existen otras pruebas tan buenas como esta, pero sin los costos y los riesgos de la misma. Una prueba excelente para demostrar títulos contra *Toxoplasma gondii* es la reacción de fijación de complemento, sin embargo es muy larga en cuanto a pasos en su metodología con lo cual aumentan los riesgos de errores en su realización. La hemaglutinación y hemaglutinación directa son pruebas que se usan con muy buenos resultados, de igual forma se utiliza la inmunofluorescencia, la inmunofluorescencia indirecta y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), esta última es la técnica más empleada (Becerril, 2011).

Los anticuerpos IgG e IgM para *T.gondii* se pueden detectar de 2 a 3 semanas después de la exposición mediante un ensayo ELISA. Los niveles bajos de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* pueden indicar una infección pasada. Se pueden detectar anticuerpo IgM en más del 50% de pacientes un año después de la infección. Por lo tanto, los resultados IgM positivo se deben evaluar con una o dos muestras más si se sospecha que es una infección primaria (Becerril, 2007, Carrada, 2005).

Existen diversos paquetes comerciales que permiten la detección de anticuerpos IgG e IgM para la identificación clínica de *Toxoplasma gondii* mediante ELISA. En estas pruebas, antígenos purificados de *Toxoplasma gondii* recubren la superficie de los micropocillos. El suero del paciente diluido se añade a los pocillos, y el anticuerpo IgG o IgM específico de *Toxoplasma gondii*, si está presente, se une al antígeno. Todos los materiales no unidos son lavados. Se añade conjugado de peroxidasa de rábano (HRP), que se une al complejo de anticuerpo-antígeno. El exceso de conjugado de HRP se lava y se añade una solución de reactivo de tetrametilbencidina (TMB). La reacción catalítica del conjugado enzimático se detiene en un momento específico. La intensidad del color generado será proporcional a la cantidad de anticuerpo de IgG o IgM específica en la muestra. Los resultados son leídos por un lector de micropocillos comparados de una manera paralela con un calibrador y controles

Siendo *Toxoplasma gondii* un parásito intracelular los anticuerpos juegan un papel protector menor, siendo los linfocitos T las células esenciales en la protección

contra el parásito. La infección por *Toxoplasma gondii* induce una fuerte inmunidad celular caracterizada por una alta polarización a una respuesta Th1 en estadios tempranos de la infección, la cual se mantiene durante la fase crónica. El parásito sintetiza un compuesto llamado ciclofilina 18, el cual se une al receptor para quimiocinas CCR5 en la superficie de células dendríticas y macrófagos, lo que lleva a la producción de interleucina 12 (IL-12), la cual estimula a las células asesinas naturales (NK) y a los linfocitos T para la secreción de interferón γ (INF- γ). De esta manera el parásito induce desde el inicio un microambiente Th1, caracterizado por la presencia de IL-12 e INF- γ , lo que lleva a la diferenciación de los linfocitos T vírgenes en linfocitos Th1 que, a su vez, son productores de IL-12 e INF- γ . Se ha observado que estas dos citocinas junto con TNF- α son citocinas esenciales para la protección contra *T. gondii* (Figura 10). Las células activadas mediante el INF- γ destruyen a los taquizoítos por algunos radicales generados durante el estallido respiratorio, así como por el óxido nítrico (NO), los cuales son tóxicos para los parásitos; por otra parte, los linfocitos T CD8+ eliminan a las células infectadas con el parásito. (Becerril, 2011).

Es debido a esta respuesta inmune mediada por células Th1 que se considera a *T. gondii* como un posible patógeno modular de la respuesta inmune a alérgenos, debido a que la respuesta inmune Th1 inducida por el parásito es una respuesta de larga duración que podría bloquear la respuesta Th2 causada por los alérgenos (Fenoy y col., 2008) (Figura 11). Los estudios epidemiológicos asocian a la infección por *T. gondii* con una baja prevalencia de sensibilización alérgica, sin embargo aún no se han establecido bien los mecanismos por los cuales la infección bloquea el desarrollo de la enfermedad alérgica.

Utilizando modelos murinos de inflamación pulmonar alérgica, se ha demostrado que en la infección aguda y crónica por *T. gondii* antes de la sensibilización alérgica, bloquea fuertemente la inflamación de las vías respiratorias, además de detectarse niveles bajos de IgE específica para alérgenos, una producción reducida de IL-4 e IL-5 y una producción aumentada de INF- γ . Se hipotetiza que estos niveles elevados de INF- γ

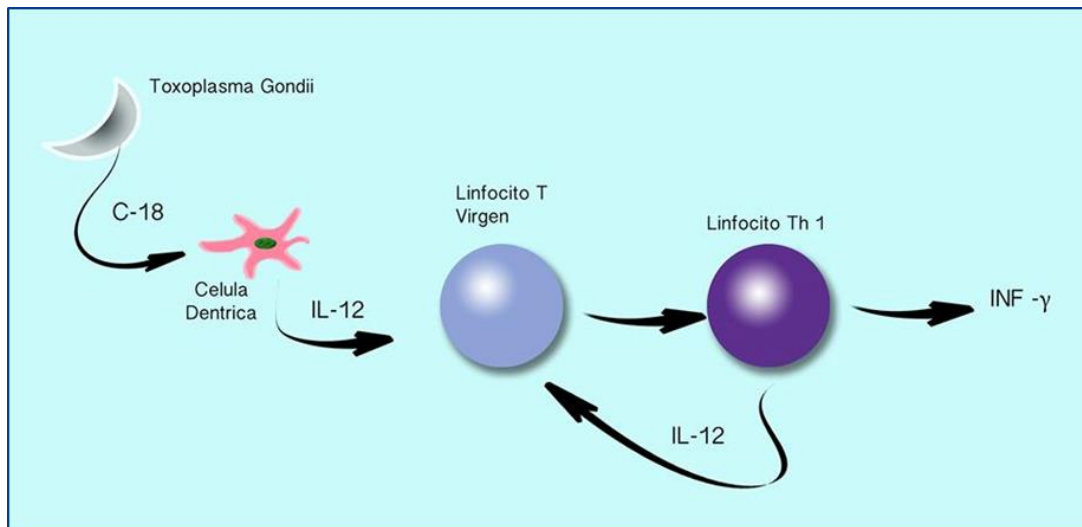


Figura10. Respuesta inmune *T. gondii*.

C-18, ciclofilina 18.

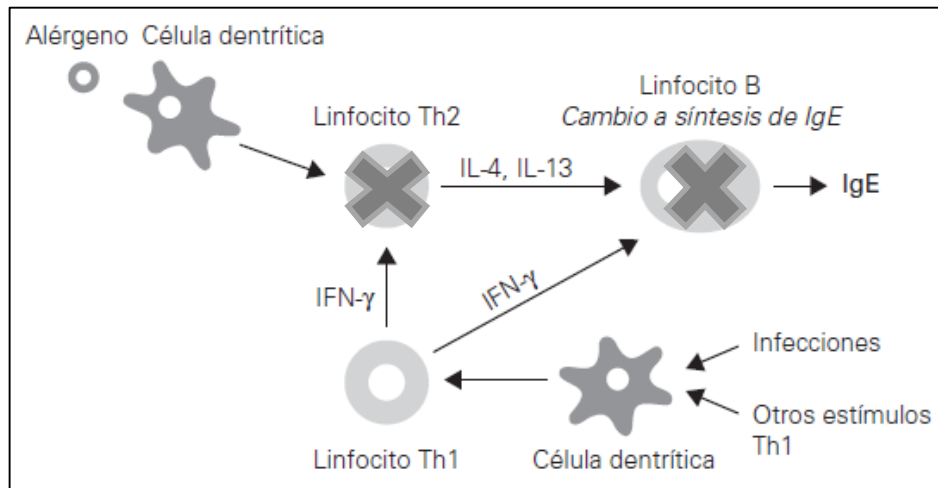


Figura 11. Inmunorregulación de la respuesta inmune a alérgenos.

Fuente: Modificado de Cárdenas y col., 2005.

secretados en respuesta a la infección por *T. gondii* en la fase aguda de la infección son los que le confieren un poder protector contra la inflamación alérgica, y aunque los niveles de citocinas Th1 disminuyan en la fase crónica, pudieran ser suficientes para inhibir la diferenciación de linfocitos T virgen a linfocitos Th2 (Fenoy y col, 2008; Fenoy y col., 2012). Por lo tanto es importante establecer si existe una asociación entre la presencia de anticuerpos anti *T. gondii* y sensibilización alérgica, ya que contribuye al conocimiento de cómo la respuesta inmune a alergenos es inmunorregulada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de Estudio

El presente trabajo es un estudio transversal que incluyó a 80 individuos de entre 3 y 6 años de edad los cuales se definieron como sensibilizados y no sensibilizados mediante el ensayo cualitativo Phadiatop®. Se realizó un muestreo no probabilístico, por conveniencia, de niños inscritos en centros de educación preescolar autorizados por la Secretaria de Educación y Cultura (SEC), los cuales están ubicados en distintos puntos de la ciudad de Hermosillo, Sonora (Figura 12). Se acudió a dichos centros preescolares en los cuales se impartió una plática informativa a los padres de los niños, aquellos padres que aceptaron que sus hijos participaran firmaron un consentimiento informado y se estableció la fecha para la entrega de muestras de heces y toma de muestras sanguíneas. El proyecto fue aprobado por el comité de bioética de la Universidad de Sonora.

Criterios de Inclusión

Niños de 3 a 5 años de edad, de ambos sexos con resultado negativo al examen coproparasitoscópico.

Criterios de Exclusión

Niños de 3 a 5 años de edad, de ambos sexos con resultado positivo al examen coproparasitoscópico.

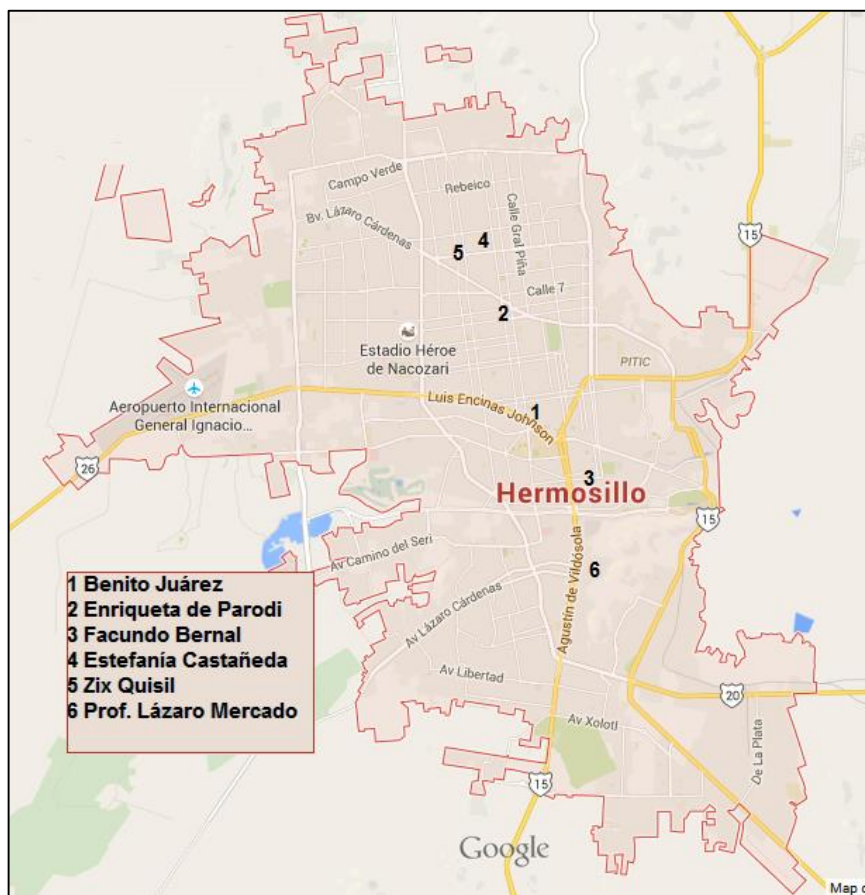


Figura 12. Ubicación de los centros preescolares seleccionados.

Criterios de Eliminación

Cambio de residencia de los niños o de centro de educación preescolar, retiro de consentimiento informado en cualquier momento durante el curso del estudio, por parte de los padres o tutor y niños que no completaron las evaluaciones.

Toma y Procesamiento de las Muestras

Se solicitó a los padres proporcionar muestras de heces de 3 días diferentes, para descartar parasitosis.

Las muestras sanguíneas fueron tomadas en tubos sin anticoagulante (Bd Vacutainer® serum) de 6 mL, las muestras de sangre se dejan coagular de 60 a 120 minutos. El suero es almacenado a -20° C hasta su análisis. Esta es la temperatura de almacenamiento a la cual, el fabricante de los paquetes comerciales para la búsqueda de anticuerpos e interleucinas, garantiza la estabilidad de los anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* y la inmunoreactividad de IL-4, IL-5, IL-13 e INF- γ humana en suero, así como su estabilidad a la congelación y descongelación, para su análisis por ELISA.

Técnica de Concentración por Sedimentación Ritchie

La técnica de Ritchie es un método de concentración en el que se sedimenta la materia fecal a examinar, es muy útil para encontrar huevecillos, quistes y trofozoitos muy pesados (Uga y col, 2010). Para su realización se toma aproximadamente 1 gr. de la materia fecal que se homogeniza en solución salina. La suspensión es filtrada a través de una gasa colocada en un embudo recogiendo el filtrado en un tubo cónico. El filtrado se centrifuga durante 2 minutos a 2000 rpm, se decanta el sobrenadante y el sedimento es resuspendido con solución salina; se repiten estos pasos hasta que el sobrenadante se aclarare. Al último sedimento se le agregan 5 mL de solución de formaldehído al 10%, se mezcla y deja reposar durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se le añaden 0.5 mL de éter, se tapa el tubo y agita enérgicamente durante 30 segundos, para

posteriormente centrifugarlo durante 2 minutos a 2000 rpm. Después de centrifugar se observan 4 capas: éter en la superficie, un tapón de heces fecales, formaldehído, y el sedimento en el fondo del tubo. El sobrenadante es descartado y con una pipeta Pasteur se obtiene una gota de sedimento, se mezcla con una gota de lugol y se coloca en un portaobjetos para su observación microscópica a 10 y 400X.

También, se realiza la observación macro y microscópica en fresco (solución salina 0.9%).

Prueba de Sensibilización

La detección de sensibilización alérgica se lleva a cabo mediante el ensayo cualitativo Phadiatop® en el equipo automatizado ImmunoCAP. Se basa en un inmunoanálisis en sándwich, en el cual la matriz está compuesta por el 98% de alérgenos inhalantes relevantes unidos de forma covalente a la fase sólida. 50 µl de la muestra de suero es añadida y la IgE específica reaccionará con el alérgeno unido a la matriz, las uniones no específicas serán eliminadas mediante lavados. Se añaden 50 µl un segundo anticuerpo contra IgE marcado con enzimas y se realiza nuevamente un lavado que permitirá eliminar aquellos anticuerpos no unidos. Se añaden 50 µl de un agente desarrollador de fluorescencia y se incuba. La reacción se detiene mediante la adición de 40 µl de solución de parada de reacción y la fluorescencia se mide mediante un fluorómetro integrado al equipo y cuanto más elevada sea ésta, mayor será la presencia de IgE en la muestra. Se utiliza el calibrador 0,35 KU/L para IgE específica como punto de corte (Eriksson, 2009; Rose y col., 2002).

Prueba serológica para anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*. ELISA

La detección de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* se llevó a cabo mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se utilizó el paquete comercial para *Toxoplasma* IgG de MBM. Se añadieron 10 µl de suero con 200 µl del diluyente y

100 μ l de la mezcla se dispensaron en los pocillos. Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente (20-25°C) por 20 minutos. Se lavó la placa tres veces con 300 μ l de solución de lavado y se añaden 100 μ l de la enzima conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) a cada pocillo, se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y, nuevamente, se lavó tres veces la placa con 300 μ l de solución de lavado. Se añadieron 100 μ l de tetrametilbencidina (TMB) a cada pocillo y se incubó por 10 minutos. Pasado ese tiempo se detuvo la reacción añadiendo 100 μ l de la solución de parada a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm. Aquellas muestras cuya absorbancia fue mayor al punto de corte fueron consideradas positivas. El punto de corte para cada ensayo fue obtenido mediante la multiplicación del promedio de la densidad óptica del calibrador por un factor de corrección impreso en la etiqueta del calibrador.

Determinación de Interleucinas

La técnica ELISA es considerada el método de medición estándar de citocinas y es ampliamente utilizado en laboratorios clínicos y de investigación biomédica. (Foster, 2001). Se utilizaron las pruebas comerciales Thermo SCIENTIFIC para la determinación de IL-4 e IL13 por ELISA (EH3IL4, EHIL13) y la prueba comercial eBioscience para la determinación de IL-5 por ELISA (BMS278). En general la metodología se desarrolló como se describe a continuación con ligeras variantes dependiendo la prueba. Se añadieron 500 μ l de diluyente estándar seguido por 50 μ l de las muestras en cada pocillo por duplicado. Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente (20-25°C) por 2 horas. Se lava la placa tres veces con solución de lavado y se añaden 100 μ l de anti IL-4 conjugada con HRP a cada pocillo. Se incubó a temperatura ambiente por 1 hora y se lavó tres veces la placa. Se añaden 100 μ l de TMB a cada pocillo y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos. Pasado ese tiempo se detiene la reacción añadiendo 100 μ l de la solución de parada a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm.

Análisis Estadístico

Primeramente se realizó un análisis exploratorio de la base de datos con el fin de detectar posibles errores y caracterizar el grupo de estudio mediante medidas de frecuencias y de tendencia central (mediana y cuartiles). Posteriormente se desarrolló el análisis univariado en el cual se evaluó la asociación entre las variables de hipótesis, de respuesta y confusoras ($p > 0.2$). Las variables que mostraron una asociación suficiente se utilizaron para generar el modelo de regresión lineal múltiple donde solo se incluyeron aquellas variables con una asociación estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Así mismo se evaluó interacción, colinealidad y se comprobaron los supuestos del modelo (linealidad, homocedasticidad y normalidad). Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico STATA versión 12.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Población de Estudio

Se incluyeron en el estudio a 80 niños en un intervalo de edad 3-6 años y con una media de 5 años de edad. En la Tabla V se muestra las características de la población de estudio y se puede observar que no existe diferencia en las medianas de la edad y en el número de niñas y niños incluidos.

Estudio Coproparasitoscópico

Este estudio fue realizado con la finalidad de excluir del estudio a aquellos niños que presentaran parásitos con migración visceral, ya que estos causan una elevación en los niveles de IgE lo cual produciría falsos positivos en el estudio de sensibilización alérgica.

Se analizaron las muestras de heces de 124 individuos, 15 (12%) de ellos resultaron positivos en al menos en una de sus muestras a *Endolimax nana* (n=9, 7%), *Giardia lamblia* (n=4, 3%), *Entamoeba coli* (n=3, 2%) e *Iodamoeba butschlii* (n=1, 0.8%); en ninguno de los niños fue detectada la presencia de helmintos. En México, la prevalencia de parasitosis intestinales en escolares asintomáticos en la región noroeste se reporta en un 35%, siendo *Giardia lamblia*, *Endolimax nana* y *Entamoeba coli*, las causas principales de parasitosis; resultados consistentes con lo encontrado en nuestra población, además la prevalencia encontrada (12%) es menor comparada con la reportada en otros estudios en población infantil. Sin embargo existen reportes contradictorios sobre la prevalencia de parasitosis en niños menores de 6 años, debido a que en algunos se reportan bajas prevalencias, no así en otros, lo cual podría deberse a la mayor atención que se presta a niños pequeños reduciendo así las posibilidades de infección (Díaz y col., 2014; Quihui y col., 2012).

Tabla V. Características de la población de estudio.

Mediana y Rango Intercuartil				
Variable	Mujeres (n=38)	Hombres (n=42)	<i>p</i>	Total (n=80)
Edad	4.5 (5-4)	5 (5-4)	0.879	5 (5-4)
IL-4	1.4 (7-1)	1.6 (8-1)	0.337	6.5 (7-1)
IL-5	8.9 (11-3)	7.5 (11-3)	0.916	8.3 (11-3)
IL-13	3.3 (7-2)	2.8 (6-2)	0.408	3 (6-2)
Sensibilización	23%	33%	0.158	29%

Variabes cuantitativas se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. Variabes cualitativas mediante Chi cuadrada. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p > 0.05$). Niveles de interleucinas en pg/mL.

Sensibilización Alérgica

Se analizaron 80 muestras de las cuales 23 resultaron Phadiatop positivo siendo la prevalencia de sensibilidad alérgica en el grupo de estudio del 29% para alérgenos inhalantes (Tabla V), similar a lo encontrado en la bibliografía donde se reporta una prevalencia de sensibilización a alérgenos inhalantes del 26% en niños de 1 a 6 años de edad y la cual aumenta conforme va aumentando la edad, además de que la incidencia de polisensibilización también es mayor a la incidencia de monosensibilización (Kim y col., 2014).

En un estudio publicado en 2009 por López y colaboradores en población general en la Ciudad de México, encontraron una prevalencia de enfermedad alérgica del 35.8% en niños de entre 3 y 6 años de edad; además encontraron una prevalencia de rinitis alérgica del 19.6%. Es importante tener en cuenta al hablar de prevalencia de sensibilidad alérgica que esta puede variar de una región a otra dependiendo directamente de las condiciones climáticas, vegetación existente y de los métodos utilizados para detectarla, además de los factores relacionados con el individuo como genes predisponentes de atopia, obesidad, alimentación, entre otros (Bäcker y col., 2009; Bedolla y col., 2010).

Además de los factores genéticos que son un importante factor de riesgo para el desarrollo de sensibilidad alérgica, el sexo (masculino) también se ha visto que es un factor que predispone a enfermedades alérgicas en la infancia. Los niños son más propensos a tener sensibilización alérgica, dermatitis atópica y rinitis. De hecho en la Tabla V se puede observar un ligero aumento en la prevalencia de sensibilización alérgica en los niños en comparación de las niñas, aunque dicha diferencia no resultó significativa, si nos permite observar la misma tendencia que la reportada en la bibliografía (Kim y col., 2014; Miguera y col., 2014).

Valores de Interleucinas

Se analizaron los niveles de interleucinas en el grupo de individuos sensibilizados y en el grupo de individuos no sensibilizados. Los valores obtenidos para cada población se muestran en la Tabla VI

Para establecer si existía alguna asociación entre los niveles de interleucinas y sensibilización alérgica en la población de estudio se llevó a cabo un modelo de regresión lineal múltiple (Tabla VII). Los resultados arrojaron que no existe una asociación significativa entre los valores de interleucinas obtenidos en individuos sensibilizados y no sensibilizados para las interleucinas estudiadas con un valor de $p > 0.05$.

Existen estudios que analizan el comportamiento de los niveles de interleucinas encontrados en individuos con enfermedades alérgicas tales como dermatitis atópica y rinitis alérgica. Deo y colaboradores en 2010 buscaron diferencias en los niveles séricos de interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 mediante ELISA, en individuos con diferentes tipos de enfermedades alérgicas y en individuos sanos. Ellos encontraron que los niveles de estas interleucinas eran significativamente mayores en los individuos con enfermedades alérgicas. De la misma manera, en un estudio publicado en 2004 por López y colaboradores, reportan que los niveles de IL-4 e IL-5 se encuentran aumentados en pacientes con rinitis alérgica en comparación con pacientes sanos. Sin embargo estos resultados no pueden compararse con los de nuestro estudio, ya que la población de estudio de estas dos investigaciones fueron adultos con una edad promedio de 33 años, mientras que nuestra población de estudio son niños con una edad promedio de 5 años.

En la literatura es escasa la información disponible sobre los niveles de estas interleucinas en población infantil. En 2007 Cárdenas y colaboradores realizaron un estudio en sangre de cordón umbilical, donde se analizaron los niveles de IL-4, IL-13 además de IL-10 e INF- γ en recién nacidos sanos y en recién nacidos con historia familiar directa de atopia. Sin embargo no obtuvieron valores de IL-4 e IL-13 y los

Tabla VI. Niveles de interleucinas.

Mediana y rango intercuartil			
	No sensibilizados (n=23)	Sensibilizados (n=57)	<i>p</i>
IL-4	1.8 (7-1)	1.4 (8-1)	0.425
IL-5	6.9 (9-3)	9 (11-3)	0.234
IL-13	4.2 (6-1.5)	2.6 (6-1.5)	0.408

VARIABLES CUANTITATIVAS SE ANALIZARON MEDIANTE LA PRUEBA U DE MANN-WITHNEY. NO SE ENCONTRARON DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS EN NINGÚN GRUPO ($p > 0.05$). NIVELES DE INTERLEUCINAS EN PG/mL.

Tabla VII. Asociación de los niveles de interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 y sensibilización alérgica.

	Niveles de Interleucina IL-4		Niveles de Interleucina IL-5		Niveles de Interleucina IL-13	
	β	<i>p</i>	β	<i>p</i>	β	<i>p</i>
	Sensibilización alérgica					
Negativo	Referencia		Referencia		Referencia	
Positivo	0.566	0.527	-0.895	0.494	0.8796316	0.264

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE AJUSTADO POR EDAD Y SEXO. NO SE ENCONTRARON DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE GRUPOS ($p > 0.05$).

valores de IL-10 no fueron significativos. Otros estudios muestran que en niños de 1 año de edad existe una asociación entre niveles incrementados de IL-5 e IL-13 y marcadores de atopia (eosinofilia e IgE total), mientras que otros estudios observan que los niveles de las citocinas Th2 aumentan desde el nacimiento hasta los 2 años en niños que presentaron enfermedad alérgica a los 6 años (Neaville y col, 2003; Prescott y col, 2003).

Estas observaciones junto con los resultados obtenidos en el presente trabajo permite inferir que el comportamiento de las citocinas Th2 varía conforme la edad y que niveles detectables de las IL-4, IL5 e IL-13 son alcanzados una vez que se presenta la fase crónica de la enfermedad alérgica, la cual no cursan los niños en estos rangos de edad y que si es presentada por adultos. También existen muchos otros factores a considerar como son la presencia de patógenos modulares de la enfermedad alérgica, índice de masa corporal y comorbilidades, entre otros aspectos que no estén siendo evaluados y que estén alterando los niveles de citocinas.

Prevalencia de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii*

No existen referencias actualizadas sobre la prevalencia de anticuerpos anti-*T.gondii* en el estado de Sonora, la última referencia reportada para México es del 2005 e indica una prevalencia poblacional del 30%, donde las áreas con mayor prevalencia fueron las zonas costeras húmedas del Pacífico y del Golfo de México; mientras que la región árida norteña tuvo la prevalencia más baja con un 19%. Además con respecto a rangos de edad la prevalencia de anticuerpos va aumentando con la edad, teniendo la prevalencia más baja los niños entre 1 y 4 años (10-12%), mientras que los individuos en el rango de edad de 45 y 49 años tuvieron la prevalencia más alta de anticuerpos anti *T. gondii* (22 - 26%) (Carrada, 2005).

En el presente estudio no se detectaron anticuerpos anti *T. gondii* en ninguna de las 80 muestras incluidas. Las razones de este resultado podrían ser que tanto la región, como la población de estudio, son de bajo riesgo de adquirir la infección. Es importante

señalar que la toxoplasmosis ha sido descrita como una enfermedad causada por un saneamiento deficiente, pobreza, ciertos hábitos alimenticios (consumir carnes crudas o poco cocidas) y pobre higiene, por lo cual la ausencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii*, puede deberse a que los centros prescolares en los cuales se llevó a cabo el reclutamiento de los niños no pertenecen a zonas con estados de marginación alto, los cuales están fuertemente asociados con estos factores de riesgo (Carrada, 2005; Gyang y col., 2014).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo la prevalencia de sensibilización alérgica a alérgenos inhalantes fue del 29% y no existieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de interleucinas en individuos con sensibilización alérgica y en individuos sin sensibilización alérgica, con lo cual podemos inferir que el comportamiento de los niveles de interleucinas difiere en población infantil, debido al hecho de que los niños sensibilizados no han desarrollado sintomatología, la cual se manifiesta con el aumento de la concentración sérica de estos marcadores y en comparación, la población adulta ha presentado múltiples episodios alérgicos a lo largo de su vida y presenta síntomas característicos de enfermedad alérgica y por lo tanto difieren en los niveles de estas interleucinas, siendo sus niveles más elevados que en los infantes y en población adulta no sensibilizada.

La ausencia de diferencias en la concentración sérica de IL-4, IL-5 e IL-13 en el grupo de estudio, indica que los niños no han avanzado a través de la “marcha alérgica”.

No se encontró prevalencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii*, por lo cual no se pudo establecer una asociación con sensibilización alérgica, sin embargo la infección por *T. gondii*, es uno de los muchos factores que pueden estar influyendo en la inmunomodulación de la respuesta a alérgenos y se pueden continuar analizando otros factores que estén relacionados con la prevalencia de enfermedades alérgicas y los niveles de interleucinas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. 2012. Cellular and molecular immunology, 7th ed. Elsevier. Madrid.
- Alcantara-Neves, N.M., Britto, G.S.G., Valente-Veiga, R., Figueiredo, C.A., Fiaccone, R.L., Conceicao, J.S., Cruz, A.A., Rodrigues, L.C., Cooper, P.J., Pontes-de-Carvalho, L.C., Lima-Barreto, M. 2014. Effects oh helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. *BMC Research Notes*. 7:817-824.
- Arruda Chaves, E. 2004. Pruebas diagnósticas en alergia y su utilidad clínica. *Rev Med Hered*. 15(2): 113-117
- Aviña-Fierro, J.A., Castañeda-Gaytan, D. 2006. Marcha alérgica: el camino de la atopia. *Alerg Asma Inmunol Pediatr*. 15(2): 50-56.
- Bäcker, C., Barraza-Villareal, A., Moreno-Macías, H., Escamilla-Núñez, C., Romieu, I. 2009. Efecto del ambiente rural sobre la prevalencia de rinirris alérgica en escolares de Mexicali, Baja California, México. *Rev Panam Salud Public*. 25(5): 431-437.
- Ballardini, N., Nilsson, C.M., Lilja, G. 2006. ImmunoCAP Phadiatop Infant—a new blood test for detecting IgE sensitization in children at 2 years of age. *Allergy*. 61(3): 337-43.
- Becerril, M. A. 2011. Parasitología Médica, 3ra edición. McGraw-Hill. México.
- Bedolla-Barajas, M., Hernández-Colin, D.D. 2010. Sensibilización a alergenos en sujetos con rinitis alérgica que viven en la zona metropolitana de Guadalajara, México. *Revista Alergia México*. 57(2): 50-53.
- Bousquet, J. 2012. Allergic rhinitis and it's impact on asthma (ARIA) achievements in 10 years and future needs. *The journal of allergy and clinical immunology*. 130(5):1050-1062.

- Cantani, A. 2008. *Pediatric allergy, asthma and immunology*, 1ed. Springer. Berlin.
- Cárdenas Guerrero, P., Fernández Lorenzo, J.M., Martínez-Cañavate Burgos, A., Ramírez, A., Jiménez-Casquet, M.F., Pérez Aragón. A., Rojo-Hernandez, A., Montoza-Aguado, M. 2005. Niveles de interleucinas en sangre de cordón: relación con antecedentes familiares de enfermedades alérgicas. *Allergol et Immunopathol.*33(3): 131-137.
- Carrada-Bravo, T. 2005. Toxoplasmosis: parasitosis reemergente del nuevo milenio. *Rev Mex Patol Clin.* 52(3): 151-162.
- Cooper, P.J., Vaca, M., Rodriguez, A., Chico, M.E., Santos, D.N., Rodrigues, L.C., Barreto, M.L. 2014. Hygiene, atopy and wheeze-eczema-rhinitis symptoms in schoolchildren from urban and rural Ecuador. *Thorax.* 64: 232-239.
- Díaz-Reyes, G.A., Ortega-Fonseca, X.F., Veldriain-Díaz, M.C., Urías-Estrella, D.M., Roman-Mendevil, E. 2014. Determinación de enfermedades parasitarias en población infantil de primer a cuarto grado de educación primaria en un ejido del sur de Sonora. *EPISTEMUS.* 16: 44-47.
- Del Rio Navarro, B. E., Luna Peach, J. A., Berber, A., Zepeda Ortega, B., Avila Castañon, L., Del Rio Chivardi, J. M., y otros. 2007. Factors Associated With Allergic Rhinitis in Children From Northern Mexico City. *J Investig Allergol Clin Immuno.*, 17(2): 77-84.
- Deo, S.S., Mistry, K.J., Kakade, A.M., Niphadkar, P.V. 2010. Role payed by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lung India.* 27(2): 66-71.
- Eriksson, N.E. 2009. Phadiatop. *Allergy.* 45:285-292.
- Ellertsen, L.K., Hetland, G., Lovik, M. 2008. Specific IgE respiratory allergens and IgG antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Streptococcus pneumoniae* in Norwegian military recruits. *Scandinavian journal of immunology.* 67: 496-500.

- Fenoy, I.M., Chiurazzi, R., Sanchez, V.R., Argenziano, M.A., Soto, A., Picchio, M.S., Martin, V., Goldman, A. 2012. *Toxoplasma gondii* infection induces suppression in a mouse model of allergic airway inflammation. *PLoS ONE*. 7(8):e43420.
- Fenoy, I., Giovannoni, M., Batalla, E., Martin, V., Frank, F.M., Piazzon, I., Goldman, A. 2008. *Toxoplasma gondii* infection blocks the development of allergic airway inflammation in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol*. 155: 275-284.
- Fernandes, J.F.C, Taketomi, E.A., Mineo, J.R., Miranda O.D., Alves, R., Resende, R.O., Ynoue, L.H., Sung, S.J., Silva, D.A.O. 2010. Antibody and cytokine responses to house dust mite allergens and *Toxoplasma gondii* antigens in atopic and non-atopic Brazilian subjects. *Clin Immunol*. 136(1):148-156.
- Foster, J.R. 2001. The functions of cytokines and their uses in toxicology. *Int J Exp Pathol*. 82(3): 171–192.
- González, P., Arancibia, J. C. 2006. La marcha atópica. *NeumologiaPediátrica*. 1(3): 124 - 128
- Gyang, V.P., Akinwate, O.P., Lee, Y.L., Chuang, T.W., Orok, A., Ajibaye, O., Liao, C.W., Cheng, P.C., Chou, C.M., Huang, Y.C., Fan, K.H., Fan, C.K. 2015. *Toxoplasma gondii* infection: seroprevalence and associated risk factors among primary school children in Lagos city, Southern Nigeria. *Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48(1): 56-63.
- Hawladar, M.D.H., Ma, E., Noguchi, E., Itoh, M., Arifeen, S.E., Persson, L.A., Moore, S.E., Raqib, R., Wagatsuma, Y. 2014. *Ascaris lumbricoides* infection as risk factor for asthma and atopy in rural Bangladeshi children. *Tropical Medicine and Health*. 42(2): 77-85.
- Ingram, J. L., & Kraft, M. 2012. IL-13 in asthma and allergic disease: Asthma phenotypes and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol*.130(4): 829-842.

- Kips, J.C., Tournoy, K.G., & Pauwels, R.A. 2001. New anti-asthma therapies: suppression of the effect of interleukin (IL)-4 and IL-5. *European Respiratory Journal*. 17: 499-506.
- Kim, H.Y., Shin, Y.H., Hon, M.Y. 2014. Determinants of sensitization to allergen in infants and young children. *Korean J Pediatr*. 57(5): 205-210.
- Maizels, R.M., McSorley, H.J., Smyth, D.J. 2014. Helminths in the hygiene hypothesis: sooner or later? *Clin Exp Immunol*. 177: 38-46.
- Matricardi, P.M., Rosmini, F., Riondino, S., Fortini, M., Ferrigno, L., Rapicetta, M., Bonini, S. 2000. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ*. 320: 412-417.
- McCormack, M.C., Enright, P.L. 2008. Making the diagnosis of asthma. *Respiratory Care*. 53(5):583-592.
- Migueres, M., Dávila, I., Frati, F., Azpeitia, A., Jeanpetit, Y., Lhéritier-Barrand, M., Incorvaia, C., Ciprandi, G. 2014. Types of sensitization to aeroallergens: definitions, prevalences and impact on the diagnosis and treatment of allergic respiratory disease. *Clinical and Translational Allergy*. 4:16-24.
- Mora, I., Castillo Laita, J.A., Díaz Vázquez, C.A. 2007. Taller de diagnóstico de la alergia. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 9:129-133
- Mora, I., Díaz-Vázquez, C.A. 2008. Nuevas herramientas diagnósticas en alergia: utilidades en atención primaria. *An Pediatr Contin*. 6(1): 30-33.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. 2008. *Inmunobiología de Janeway*. McGraw-Hill. México.
- Nakajima, H., Takatsu, K. 2007. Role of cytokines in allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*. 142: 265-273.

- Navarro, E., Garavito, G., Barrera, L.A., Lareo, L., Egea, E. 2008. Las proteínas alergénicas: un novedoso blanco para el desarrollo de estudios en proteómica funcional. *Salud Uninorte*.24(2): 303-318.
- Neaville W.A., Tisler, C., Bhattachatya A. 2003. Developmental cytokine response profiles and the clinical and immunologic expression of atopy during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol*. 112: 740-746.
- Ngoc, L.P., Gold, D.R., Tzianabos, A.O., Weiss, S.T., Celedón, J.C. 2005. Cytokines, allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 5:161-166.
- Leng, S.X., McElhaney, J.E., Walston, J.D., Xie, D., Fedarko, N.S., Kuchel, G.A. 2008. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 63(8): 879-884.
- Lomonte, B. 2009. Técnicas de laboratorio e inmunología clínica. Universidad de Costa Rica.
- López-Velázquez, B., Bastida-Segura, D.L., Escárcega-Barbosa, D., Castrejon-Vazquez, M.I., Galicia-Tapia, J. Cano-Altamirano, S., Miranda-Tena, A.J. 2004. Determinación de interleucinas IgG4 en pacientes con rinitis alérgica con y sin inmunoterapia. *Revista Alergia México*. 51(4): 139-144.
- López-Pérez, G., Martin-Maciél, B.M., Huerta-López, J. Mejía-Covarrubias, M., López-López, J., Aguilar, G., Rivera-Pérez, J.L., Medina-López, L., Vargas, F. 2009. Prevalencia de enfermedades alérgicas en la ciudad de México. *Revista Alergia México*. 56(3): 72-79.
- Paul, W.E., Zhu, J. 2010. How are Th2-type immune response initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*. 10 (4): 225-234.
- Presscot, S.L., King, B., Strong, T.L., Holt, P.G., The value of perinatal immune responses in predicting allergic disease at 6 years of age. *Allergy*. 58: 1187-1194.

- Quihui-Cota, L., Morales-Higuera, G.G. 2012. Parasitosis intestinales en escolares tratados con albendazol en el noreste de México: estudio piloto. *BIOtecnia*. 14(2): 32-39.
- Quirós, J. 2003. Diagnóstico de alergias utilizando IgE alérgico-específico. *Rev. Méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)* .38(1-2); 20-25.
- Regueiro Gonzalez, J. R., López Larrea, C., González Rodríguez, S., Martínez Naves, E. 2010. *Inmunología: biología y patología del sistema inmunitario*. Madrid: Medica Panamericana.
- Romero-Cabello, R. 2007. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ra edición. Editorial Médica Panamericana. México.
- Rose, N., Hamilton, R., Detrick, B. 2002. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6ta edición. ASM Press. Washington.
- Rutkowski, K., Sowa, P., Rutkowska-Talipska, J., Sulkowski, S., Rutkowski, R. 2014. Allergic diseases: the price of civilizational progress. 2: 77-83.
- Scadding, G. 2014. Cytokine profiles in allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 14: 435-443.
- Seiskari, T., Kondrashova, A., Viskari, H., Kaila, M., Haapala, A.M., Aittoniemi, J., Virta, M., Hurme, M., Uibo, R., Knip, M., Hyöty, H. 2007. Allergic sensitization and microbial load – a comparison between Finland and Russian Karelia. *Clin Exp Immunol*. 148: 47-52.
- Sewell, W., Mu, H. 1996. Dissociation of production of interleukin 4 and interleukin-5. *Immunology and Cell Biology*. 74: 274-277.
- Sicherer, S. H., & Wood, R. A. 2012 . Allergy Testing in Childhood: Using Allergen-Specific IgE Test. *Pediatrics*. 129(1): 193-197.

- Singh, A., Holvoet, S., Weiss, M., Beaumont, M., Zuercher, A. W., Mercenier, A. 2011. Increased IL-5 and IL-13 cytokine level ex vivo stimulated whole blood cell from grass pollen allergic donors correlate with seasonal exposure. *Results in Immunology*.1: 18-23.
- Strachan, D.P. 1989, Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med J*. 299: 1259-1260.
- Strachan, D.P. 2000. Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. *Thorax*. 55:2-10.
- Uga, S., Tanaka, K., Iwamoto, N. 2010. Evaluation and modification of the formalin-ether sedimentation technique. *Tropical Biomedicine*. 27(2): 177-184
- Valenta R. 2002. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat Rev Immunol*. 2(6):446-53.
- Ventura, M.T., Munno, G., Giannoccaro, F., Accettura, F., Chironna, M., Lama, R., Hoxha, M., Panetta, V., Ferrigno, L., Rosmini, F., Matricardi, P.M., Barbuti, S., Priftanji, A., Bonini, S., Tursi, A. 2004. Allergy, asthma and markers of ingestion among albanian migrants to Southern Italy. *Allergy*. 59: 632-636..
- World Health Organization. 2011. White Book on Allergy 2011-2012 Executive Summary. By Prof. Ruby Pawankar, MD, PhD, Prof. Giorgio Walker Canonica, MD, Prof. Stephen T. Holgate, BSc, MD, DSc, FMed Sci and Prof. Richard F. Lockey, MD..
- Williams, C.M.M., Rahman, S., Hubeau, C. Ma, HL. 2012. Cytokine pathways in allergic disease. *Toxicologic pathology*. 40: 205-215.
- Zubeldía, J.M., Baeza, M.L., Jáuregui, I., Senent, C.J. 2012. Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA. 1ra Edición. Nerea (Ed), p. 21. Madrid, España.