



(Filiación Institucional de acuerdo a Res. HCS 1125-17)

Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas.
Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba, Argentina

Título: Influencia del tipo de alimentación en el desarrollo de la
alergia a la leche de vaca en niños pequeños
Factores involucrados en el proceso por el cual
se adquiere la enfermedad

Tesis de postgrado para optar por el título de Doctor en Medicina y Cirugía

Autor: Boudet Raúl Vicente

Correo electrónico: rulovboudet@yahoo.com.ar

Director: Profesor Doctor Juan Carlos Copioli

Fecha: 4 de Agosto de 2014



Influencia del tipo de alimentación en el desarrollo de la alergia a la leche de vaca en niños pequeños Factores involucrados en el proceso por el cual se adquiere la enfermedad por Boudet Raúl Vicente se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

***Influencia del tipo de alimentación en el desarrollo de la
alergia a la leche de vaca en niños pequeños
Factores involucrados en el proceso por el cual se
adquiere la enfermedad***

Tesis de postgrado para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía

Autor

RAÚL VICENTE BOUDET

Universidad Nacional de Córdoba

República Argentina

Año 2014

MIEMBROS DE LA COMISIÓN DE TESIS

Prof. Dr. Juan Carlos Copioli

Cátedra de UHMI N° 1 FCM, UNC.

Prof. Dra. Nelia M Geréz de Burgos

Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular FCM, UNC.

Prof. Dr. Juan Carlos Muiño

Cátedra de UHMI N° 4 FCM, UNC.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Prof. Dr. Juan Carlos Copioli y de acuerdo a la reglamentación de la carrera de doctorado vigente para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía.

El autor declara no poseer conflicto de interés alguno en la elaboración de esta obra.

Artículo 30: “La Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, no se hace solidaria con las opiniones de esta tesis”

DEDICATORIA

Para Adriana, compañera fiel en el camino de la vida.

A mis hijos, Adrián, Emanuel y Stefanía, razón de mi existir.

A la memoria de mi padre.

A la memoria de mi maestro Prof. Dr. Leonardo Manuel Vanella.

A Dios, a los amigos y a mis pacientes.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis: Prof. Dr. Juan Carlos Copioli, por honrarme con su amistad, consejo y permanente apoyo científico;

A los Sres. Profesores integrantes del tribunal de Tesis: Prof. Dr. Juan Carlos Muiño y Prof. Dra. Nelia Gérez de Burgos, por ser guías generosos y brindarme conocimientos de vital importancia para este estudio.

A la Prof. Dra. María Rosa Chaig, investigadora y docente de la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, por sus enseñanzas en el campo de la investigación genética y su incondicional apoyo.

A la licenciada Gabriela Damilano, docente de la Facultad de Ciencias Humanas de la Universidad Nacional de Río Cuarto, por su excelente y muy valioso aporte en la realización del análisis estadístico de la investigación clínica.

Al Ingeniero Químico Roberto del Valle Chaig, por su pormenorizado y destacado análisis estadístico en la investigación genética.

Al Dr. Oscar Brarda y a la Dra. Marcela Permigiani, bioquímicos especializados en Inmunología, por su calidad humana y científica en la realización de los análisis de laboratorio a nuestros pacientes.

PRÓLOGO

El estudio de la enfermedad alérgica está enriquecido por la admirable capacidad de observación y el pensamiento transformador de muchos investigadores.

Desde hace muchos años el científico se desvela en descubrir los mecanismos relacionados con su origen.

El inicio de la patología alérgica parece estar íntimamente relacionado con la exposición al primer nutriente en el útero materno y en el recién nacido.

Ahora bien, ¿si todos necesariamente debemos alimentarnos para mantener la vida, porque la madre naturaleza permite que la anomalía de la alergia por alimentos persista de generación en generación durante toda la vida del hombre sobre el planeta?

La respuesta podría hallarse parcialmente en la genética, sin embargo, actualmente existen evidencias de la existencia de otros factores que coparticipan en su desarrollo.

Entre otras, la historia natural de la alergia a la leche de vaca, es una de las más estudiadas a través del tiempo. Hipócrates ya había observado, 370 años antes de Cristo, que la leche de vaca podría causar trastornos gástricos y urticaria.

Sin embargo, todavía hoy no se conocen los mecanismos que hacen al genotipo y al fenotipo de esta enfermedad y consecuentemente su correcto diagnóstico es un verdadero desafío para el médico que la enfrenta.

Índice

RESUMEN	pág.9
ABSTRACT	pág.11
Capítulo I. INTRODUCCIÓN	pág.13
Una mirada histórica de la nutrición infantil	pág.14
<i>El primer alimento</i>	pág.14
<i>La leche de vaca: “un alimento divino”</i>	pág.14
<i>El reinado de las fórmulas lácteas</i>	pág.15
<i>Leche de madre vs. leches industrializadas</i>	pág.16
El origen de la enfermedad alérgica	pág.18
<i>Factores involucrados en su desarrollo</i>	pág.18
<i>Hipótesis de la higiene</i>	pág.18
<i>Composición de la flora: la clave de la homeostasis intestinal</i>	pág.19
<i>Exposición antigénica y el desarrollo de la tolerancia oral</i>	pág.19
<i>Flora intestinal anormal y el desarrollo de la sensibilidad alérgica</i>	pág.20
<i>Sensibilización del recién nacido</i>	pág.20
<i>Genes, ambiente y factores epi-genéticos</i>	pág.22
<i>Identificación de fenotipos</i>	pág.24
<i>Estado actual del conocimiento</i>	pág.25
Alergia a la leche de vaca	pág.26
Análisis de la diversidad genética	pág.30
Objetivos	pág.33
Capítulo II. MATERIAL Y MÉTODOS	pág.34

<i>Análisis estadístico</i>	pág.36
<i>Análisis de mutaciones o variantes en la región D-Loop del genoma mitocondrial</i>	pág.37
<i>Análisis filogenéticos</i>	pág.37
<i>Construcción del árbol filogenético</i>	pág.40
<i>Descripción del algoritmo utilizado en la investigación</i>	pág.43
<i>Caracterización filogenética de la población estudiada</i>	pág.47
Capítulo III. RESULTADOS	pág.57
Capítulo IV. DISCUSIÓN	pág.82
Capítulo V. CONCLUSIONES	pág.93
Capítulo VI. BIBLIOGRAFÍA	pág.97
ANEXO. DOCUMENTACIÓN	pág.112

RESUMEN

Antecedentes:

Los resultados de las investigaciones sobre la historia natural de la alergia a la leche de vaca (ALV) no han provisto aún, de un cuadro claro y consistente que ayude en la práctica al médico tratante.

Objetivos:

Identificar los factores involucrados en el desarrollo de la enfermedad en lactantes pequeños, con el fin de determinar perfiles específicos e índices predictivos. Estudiar la influencia de haplogrupos mitocondriales en un grupo de niños ALV, con el fin de arribar a un mejor conocimiento de la herencia biológica y genética en la etiología de la enfermedad.

Lugar de realización:

Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Diseño:

Análisis observacional y retrospectivo.

Análisis de mutaciones o variantes de la región D-loop del ADN mitocondrial.

Población:

91 niños con diagnóstico de ALV y 91 controles, de ambos sexos, menores de 6 años, mientras que 11 niños con diagnóstico de ALV y 30 controles, de ambos sexos, menores de 2 años, conformaron la población del estudio de haplogrupos mitocondriales.

Método:

Análisis de factores seleccionados de las historias clínicas, su relación individual con el diagnóstico (prueba X^2 , Odds Ratios, diferencias de medias) y su incidencia conjunta en

la probabilidad de ser ALV para determinar perfiles (Análisis de Correspondencia Múltiple y Regresión Logística). Elaboración de 3 índices predictivos basados en: Odds Ratios individuales, los correspondientes a la Regresión Logística y la identificación de criterios mayores y menores, con su respectiva evaluación de efectividad diagnóstica (sensibilidad, especificidad, valores predictivos y curva ROC).

Para el procesamiento de datos y obtención de los resultados empleados en el análisis de mutaciones o variantes de la región D-loop del genoma mitocondrial y en el estudio filogenético se utilizaron diferentes programas específicos (software) disponibles.

Resultados:

Se encontró que la edad de inicio de los síntomas, el tipo de alimentación recibida hasta el 3º mes de vida, la exposición al humo de cigarrillo, los antecedentes alérgicos maternos y el tipo de manifestaciones clínicas con que comienza la ALV, son factores que con mayor probabilidad inciden en su desarrollo, lo que permitió definir perfiles e índices predictivos.

En la investigación genética, se halló una mutación o variante nucleotídica en la transición de haplogrupos asociada a pacientes ALV con manifestaciones clínicas de Dermatitis Atópica y Enfermedad Gastrointestinal.

Conclusiones:

La utilidad de los perfiles e índices predictivos desarrollados radica en una temprana identificación de pacientes con riesgo de padecer ALV, lo que podría convertirlos en una herramienta clínica de ayuda en el manejo de esta enfermedad.

La presencia de la mutación o variante no descrita T16519C probablemente aumente la posibilidad de padecer ALV asociada con Dermatitis atópica + Enfermedad gastrointestinal.

Palabras clave: Alergia a la leche de vaca, niños, tipo de alimentación, factores genéticos, ambiente y dieta, índices clínicos predictivos, haplogrupos, mutación no descrita, genoma mitocondrial.

ABSTRACT

Background:

The results of the research on the natural history of allergy to cow's milk allergy (CMA) still have not provided a clear picture and consistent that in practice helps the attending physician.

Objectives:

To identify the factors involved in the development of the disease in young infants, in order to determine specific profiles and predictive clinical indexes.

Study the influence of haplogroup mitochondrial in a group of children ALV, in order to arrive at a better understanding of the biological and genetic heritage in the etiology of the disease.

Setting:

Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Design:

Observational and retrospective analysis.

Analysis of mutations or variants of the mitochondrial DNA D-loop region.

Population:

91 children with a diagnosis of CMA and 91 controls, of both sexes, under the age of 6 years, while 11 children with a diagnosis of CMA and 30 controls, of both sexes, under 2 years old, formed the population of the study of mitochondrial haplogroups.

Methods:

Analysis of selected factors of the clinical histories, their relationship with the individual diagnosis (test χ^2 , Odds Ratios, differences in average) and their combined impact on the probability of being CMA to determine profiles (multiple

correspondence analysis and logistic regression). Elaboration of 3 predictive indices based on: individual Odds Ratios, corresponding to the logistic regression and the identification of greater and smaller criteria, with its respective evaluation of effectiveness diagnoses (predictive sensitivity, specificity, values and ROC curve).

For data processing and the results used for the analysis of mutations or variants of the D-loop of mitochondrial genome region and the phylogenetic study used different specific programmes (software) available.

Results:

We found that the age of onset of symptoms, the type of feeding received until the 3rd month of life, exposure to cigarette smoke, the maternal allergy history and the type of clinical manifestations with that begins the CMA, are factors that most likely have an impact on its development.

Genetic research, found a mutation or variant nucleotide in the transition of haplogroups associated with CMA patients with clinical manifestations of Atopic Dermatitis and Gastrointestinal disease.

Conclusions:

The usefulness of the profiles and developed predictive indexes is an early identification of patients at risk of suffering CMA what could become a clinical tool to help in the management of this disease.

The presence of the mutation or non-descript variant T16519C is likely to increase the chance of developing CMA associated with Atopic Dermatitis + Gastrointestinal disease.

Key words: Cow's milk allergy, children, feed type, genetic factors, environmental and diet, profiles and predictive clinical indexes, haplogroups, non-descript mutation, mitochondrial genome.

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

Una mirada histórica de la nutrición infantil

El primer alimento

Biológicamente somos mamíferos y por lo tanto la leche materna es el alimento natural y óptimo para el niño. Durante miles de años nuestra especie solo disponía de leche humana para alimentar a sus crías.

Sin embargo la revolución neolítica (introducción de la domesticación de ganado vacuno que data de 6000 años AC) con la consecuente dependencia alimentaria de la agricultura y el pastoreo, propició la aparición de formas alternativas de alimentación también para los niños, ya que la leche del ganado de ordeño y las papillas elaboradas con cereales tostados y remojados, fueron buenos complementos en un primer momento y más tarde se transformaron en sustitutos de la leche materna ¹.

La leche de vaca: “un alimento divino”

La leche de vaca fue considerada como alimento por excelencia, fuente de fortaleza y de vida. Prueba de ello basta citar que en el Antiguo Testamento se habla de la tierra prometida como “tierra en la que fluye leche y miel”.

Más tarde, jueces, antiguos médicos y sacerdotes, se esforzaron en potenciar la lactancia materna y en desaprobando otras formas de alimentación infantil, tales como las nodrizas y la lactancia artificial. Sin embargo, surgen las diferencias sociales que determinan que “las reinas ni muelen ni amamantan”, lo que provoca la separación de la función nutricia de la mujer aristocrática, que pasará a ser la aspiración de los demás estratos sociales.

El amamantamiento se transforma entonces en una práctica de pobres y de nodrizas. Un dato revelador es el hallazgo, en algunas tumbas y enterramientos, de algunos utensilios relacionados con la alimentación infantil, por ejemplo: cuernos de vaca utilizados como biberones y otros recipientes hechos de madera o terracota para contener la leche ².

El reinado de las fórmulas lácteas

Desde entonces es imposible separar las fórmulas alternativas de alimentación infantil, de cambios culturales, sociales, económicos, científicos y tecnológicos. Así la introducción de la leche de los herbívoros domésticos, condicionará un cambio en el pool genético de la humanidad, es decir que la cultura pasa a constituir nuestra verdadera naturaleza.

Por otra parte, la mayoría de los mamíferos, probablemente, también de nuestros antepasados, dejaba de sintetizar lactasa (enzima que permite metabolizar la lactosa) luego de finalizado el periodo de amamantamiento. Sin embargo, en las poblaciones que ancestralmente continuaron tomando leche tras el destete, se produjo una mutación adaptativa para favorecer su tolerancia. Esta adaptación enfrentó a una diferencia fundamental del niño con respecto al adulto: la inmadurez funcional. Es decir, que la falta de maduración orgánica del recién nacido condicionó la búsqueda de requerimientos nutricionales diferentes y la obligación de ofertarlos de una determinada forma.

La revolución industrial reforzó el desprestigio de la lactancia y propugnó un modelo de “mujer libre” incorporada al trabajo. Como consecuencia, la función nutricia de la mujer se vio paulatinamente debilitada por la aparición de las leches industriales.

La formulación del sustituto lácteo, se desarrolló en paralelo al avance de los conocimientos científicos sobre la composición química de la leche, los requerimientos nutricionales del niño, la microbiología, la higiene y la expansión de los métodos de conservación. El procedimiento requería modificar (humanizar) la leche de vaca, lo que significó alterar, tratar, quitar y/o agregar diferentes ingredientes a la nueva fórmula.

Ya en el siglo XIX, la razón de mayor peso por la cual algunos médicos aconsejaban suplementar la lactancia materna desde el nacimiento, parece haber sido que la combinación de pecho y biberón durante el periodo de lactancia, permitía que el destete fuera más fácil³.

Por otro lado, el uso de diferentes tipos de fórmulas modificadas en la industria o en el domicilio (albuminosas, semidescremadas, acidificadas, condensadas,

maternizadas, etc.) generó que la Academia Americana de Pediatría (AAP), propusiera por primera vez en 1967, un modelo de fórmula infantil con niveles de nutrientes máximos y mínimos permitidos ⁴.

Más tarde en 1976, la misma AAP establece recomendaciones científicamente fundadas para la elaboración de fórmulas infantiles capaces de alimentar con garantía nutricional a niños durante sus primeros meses de vida ⁵.

Un año después la Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición (ESPAGAN) publica un informe clave (con base científica) teniendo en cuenta las necesidades y las características madurativas del lactante y la composición de la leche materna. Se propone el nombre de fórmulas infantiles para designar a las leches artificiales y se establece la diferencia entre fórmulas de inicio y de continuación ⁶. Posteriormente se publicaron informes similares para la elaboración de leches destinadas a recién nacidos de pretérmino, alérgicos o con problemas metabólicos ⁷.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) por su parte, debate y aprueba el Internacional Code of Marketing of Breast Milk Substitutes con la intención de conseguir máxima calidad en las formulas infantiles basadas en los conocimientos científicos y sujetas a una legislación ⁸.

Al respecto, tanto la OMS como el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), trabajan arduamente desde 1988, promoviendo la lactancia materna y haciendo recomendaciones específicas para el ambiente sanitario que rodea a la madre y a su bebé.

Leche de madre vs. Leches industrializadas

En los últimos años del siglo XX, se insinúa una marcada recuperación de la lactancia materna en los países desarrollados y en las clases sociales más elevadas, fenómeno imitado por los estratos sociales menos favorecidos.

En sentido contrario se introducen los denominados alimentos funcionales diseñados en base al estudio de algunos componentes de la leche de mujer con efecto sobre el crecimiento y desarrollo celular, la protección de infecciones, el efecto antioxidante, la inmunomodulación, etc.

En nuestros días, las condiciones socioeconómicas así como los avances científicos abogan por la generalización de la lactancia materna.

La biología humana ha cambiado poco en los últimos 250.000 años y la lactancia parece ser fundamental en prevenir el desarrollo ciertas enfermedades, tales como la alergia.

Actualmente se promueve devolver a la mujer y al lactante el sano derecho de amamantar y ser amamantado.

El origen de la enfermedad alérgica

Factores involucrados en su desarrollo

La patología alérgica empieza a manifestarse desde los primeros años de vida. Habitualmente se inicia con alergia a alimentos y dermatitis atópica, para más tarde aparecer rinitis y/o asma como expresiones clínicas de alergia con órgano de choque en el sistema respiratorio (marcha atópica) ⁹.

Actualmente se responsabiliza a los genes de respuesta inmunológica, relacionados con los principales complejos de histocompatibilidad, como determinantes genéticos del estado alérgico.

Todos los individuos presentan normalmente una respuesta inmune IgE, sin embargo, la especificidad alérgica y las manifestaciones clínicas del estado alérgico, parecen depender de los mencionados genes ¹⁰. La expresión de esta respuesta puede verse influenciada entre otros factores por: dosis, vía y tiempo de exposición al alérgeno, antecedentes hereditarios próximos, exposición de la madre a microbios y a humo de cigarrillo, en diversos estadios del embarazo ¹¹.

Hipótesis de la higiene

Algunos autores explican el incremento de la prevalencia de enfermedades alérgicas a nivel mundial, durante el transcurso del siglo XXI, como consecuencia de una falta de maduración del sistema inmunológico del lactante (en la desviación inmune de la respuesta tipo Th2 a Th1) debido a una insuficiente o alterada exposición a microbios ambientales en los primeros meses de la vida.

Varios trabajos de investigación sustentan este concepto denominado: “hipótesis de la higiene” ^{12, 13}. Sin embargo, este paradigma no alcanzaría para explicar el desarrollo de la enfermedad atópica, ya que si bien las respuestas del linaje celular Th2 son responsables del desarrollo de atopía, también las Th1 se encuentran involucradas en la inflamación alérgica característica del eczema y del asma.

Al respecto, existen mecanismos inmune supresivos a cargo de las células T reguladoras (implicadas en la protección contra enfermedades autoinmunes y atopía) que controlan tanto la inflamación tipo Th1 como la Th2. Defectos en la generación de

estas células intestinales, tal vez causados por una insuficiente o ausente estimulación del sistema inmune innato por microbios intestinales, originaría al fenotipo de respondedor atópico.

Actualmente se propone una extensión de la hipótesis de la higiene, en donde la actividad y composición bacteriana de la flora indígena, adquiere mayor importancia en generar señales para la maduración del sistema inmunológico infantil que la infección con patógenos ¹⁴.

Composición de la flora: la clave de la homeostasis intestinal

La colonización bacteriana del intestino con predominio de lactobacilos y bifidobacterias, comienza rápidamente después del nacimiento y depende directamente de: a) factores genéticos, b) tipo de parto, c) flora del intestino materno y d) ambiente.

Más tarde, el tipo de alimentación que recibe el niño, afecta la selección de las especies microbianas que integran la flora. La alimentación con leche materna adquiere relevancia al promover el crecimiento y la actividad de las principales bacterias comensales ¹⁵.

El requerimiento de una respuesta inmune innata a bacterias entéricas, con el fin de promover respuestas de tolerancia inmunológica, fue observado en modelos animales de experimentación.

En ratones de laboratorio libres de gérmenes, este fenómeno no se desarrollaba, pero si se establecía cuando la flora era reconstituida con bifidobacterias durante el período neonatal y no más tarde ¹⁶

Lo anteriormente expuesto sugiere que el tipo de tipo de microbiota intestinal del recién nacido es crucial en este contexto.

Exposición antigénica y el desarrollo de la tolerancia oral

Tanto la alimentación con fórmulas líquidas como con alimentos, está íntimamente relacionada con la exposición entérica a antígenos alimentarios. Esto induciría una respuesta inmunológica sistémica, regida por el tejido linfático asociado al intestino

(GALT), denominada tolerancia oral y que ha sido definida como la supresión específica de las respuestas de inmunidad celular y/o humoral a un antígeno administrado por vía oral¹⁷.

Flora intestinal anormal y el desarrollo de la sensibilización alérgica

En estudios epidemiológicos, la presencia de un reducido número de bacterias comensales en el intestino del neonato, precede al desarrollo de atopía.

Niños alérgicos han exhibido una flora alterada en su composición: altos niveles de clostridium y bajos de bifidobacterias, contrastando con niños no alérgicos, colonizados con una importante cantidad de *Bifidobacterium bifidum*, típico de los lactantes alimentados con pecho materno¹⁵. Sin embargo, lactantes con síntomas de alergia respiratoria no mostraron alteración en la constitución de su flora intestinal.

Otras investigaciones han observado también diferencias cualitativas: las bifidobacterias intestinales de niños alérgicos tenían distinta capacidad de adhesión a la mucosa e inducían más citocinas pro inflamatorias que las provenientes de niños sanos¹⁸.

Recientemente, se pudo descifrar la caracterización y variabilidad genética de las comunidades microbianas que viven en el tubo digestivo. Según este estudio, independientemente de su procedencia, raza, entorno o tipo de dieta, los humanos pueden congregarse en tres grandes grupos, según la bacteria dominante. Esta bacteria determina que especies pueden convivir con ella.

En el futuro, el conocimiento de la funcionalidad alterada de la flora intestinal, permitirá saber que hay en exceso o que falta para poder corregirlo como parte del tratamiento del desorden intestinal¹⁹.

Sensibilización del recién nacido

El recién nacido es capaz de montar una respuesta inmunológica significativa a los alérgenos ambientales²⁰. Virtualmente todos los neonatos, con o sin antecedentes hereditarios de alergia, poseen células T respondedoras a ingestantes e inhalantes²¹.

Por lo tanto, la predicción de la enfermedad alérgica es un prerrequisito indispensable para procurar su prevención y se basa en el análisis de los factores genéticos, de las condiciones del embarazo y del entorno neonatal del niño ²². Su propósito es la detección del recién nacido de “alto riesgo” de padecer alergia. En ese sentido, junto con los antecedentes hereditarios próximos, el dosaje de IgE en sangre de cordón umbilical, es uno de los parámetros más útiles ²³.

Según nuestra experiencia y para nuestro medio, los niveles de IgE en sangre de cordón que son mayores a 0.05 UI/ml, deben ser considerados como indicativos de riesgo ²⁴.

También, desde no hace mucho tiempo, se ha demostrado que algunos de los pacientes que padecen alergia a alimentos mediada por IgE, tienen alta probabilidad de desarrollar alergia a otros alimentos como así también a inhalantes ²⁵.

En esta línea de investigación hemos comunicado nuestras observaciones sobre las características del asma por alimentos (en lactantes y niños pequeños) y señalamos que en muchos casos, la fisiopatología inmunológica podría estar vinculada a otras no inmunológicas ²⁶.

También, en otro trabajo colaborativo multi-céntrico, estudiamos niños alérgicos en los cuales se determinó el comportamiento de algunos parámetros inherentes a la enfermedad alérgica, con especial referencia a las reacciones de hipersensibilidad provocadas por alimentos.

En este estudio, concluimos que el tipo de alimentación recibida durante los primeros estadios de la vida y los inhalantes ambientales a los cuales el paciente estuvo expuesto en su momento, cobran singular importancia en determinar la edad de comienzo de la enfermedad, su localización orgánica y su evolución.

Atribuimos la mayor incidencia de la alergia a leche de vaca en niños menores de 1 año de edad, a una falta total o parcial de la lactancia materna y al ingreso de proteínas heterólogas complejas (por la inmadurez digestiva, inmunológica y neurológica del niño) ²⁷.

Al respecto, hoy se acepta que tanto el recién nacido como el lactante pequeño, inician sus experiencias inmunológicas exponiéndose a una importante carga de

alergenos ingestantes sin haber completado la maduración de la barrera intestinal, hecho de trascendental importancia en un futuro no mediato ²⁸.

Genes, ambiente y factores epi-genéticos

La alergia alimentaria (AA) y en particular la mediada por IgE, es un problema de la salud pública a nivel global con marcado crecimiento en los últimos años.

El aumento de su incidencia está ocurriendo más rápidamente de lo que permitirían los cambios en el genoma ^{29,30}. Existen evidencias que señalan un notable aumento en niños menores de 1 año de edad ³¹. Esto sugiere que factores ambientales, asociados con el “moderno estilo de vida”, podrían interactuar con el riesgo genético para su desarrollo ³².

Al respecto, la historia familiar de atopía es un importante factor de riesgo para el desarrollo de la AA, así como la comorbilidad con otras enfermedades atópicas tales como asma y eczema ³³. En este sentido, el fenotipo es el resultado de la interacción del genotipo (totalidad de la información genética que posee un organismo en particular en forma de ADN) y el medio donde se exprese (ambiente). Así es como algunos genes solo expresan un fenotipo dado bajo ciertas condiciones ambientales, mientras que inversamente algunos fenotipos son determinados por varios genes (poligenia). Por ello, recientemente se ha acrecentado el interés en estudiar el papel que tienen las modificaciones epi-genéticas del genoma, como el principal mediador de la interacción gen-ambiente, con la esperanza de alcanzar un mejor conocimiento de los mecanismos involucrados en la etiología y la biología de la enfermedad.

El término epi-genética abarca actualmente el estudio de los cambios heredables en patrones de expresión de genes, independientemente de los cambios en las secuencias del ADN. El epi-genoma puede cambiar y adaptarse a estímulos ambientales en un relativo corto tiempo y también estar sujeto a modificaciones epi-genéticas en el transcurso de la vida en respuesta a factores ambientales ³⁴.

Existe profusa evidencia que sugiere que el temprano desarrollo (en útero y en el recién nacido) representan momentos de la vida especialmente vulnerables a la disrupción epi-genética ³⁵.

Uno de los factores epi-genéticos más estudiado del entorno ambiental materno es la dieta, probable responsable del desarrollo de la AA. Al respecto, se conoce que la nutrición es un importante modificador de la metilación del ADN.

Más aún, la metilación también ha sido asociada con la exposición al humo de cigarrillo, otro modificable factor del estilo de vida ³⁶.

Muchos estudios han demostrado que la metilación del ADN y los cambios resultantes en la estructura de la cromatina son los primeros reguladores de la diferenciación de las células Th naive.

Como se sabe, en el momento del nacimiento hay un desvío hacia el perfil celular Th2 asociado a perfiles de citocinas, incluyendo la inter-leucina 4 (IL-4) ³⁷. Esto normalmente no persiste, por el contrario, se aumenta la diferenciación de las células Th0 hacia el linaje Th1 con un concomitante incremento de interferón gamma (IFN- γ).

Este fenómeno se asocia con un incremento de los niveles de metilación del gen de la IL-4 y con la pérdida de la metilación de las regiones que regulan el IFN- γ en las células Th1. A la inversa la metilación del gen que codifica IFN- γ está asociada con la polarización celular Th2 ³⁸.

Resumiendo, la interrupción o interferencia externa del camino apropiado para la diferenciación celular (células Th) y de su correspondiente expresión del perfil de citocinas, durante el periodo postnatal temprano, representa una vía potencial para el desarrollo de alergia.

De esta forma, en los potenciales cambios de los perfiles celulares del linaje Th1 /Th2, la desregulación epi-genética, podría desempeñar un importante papel en determinar los niveles de otras importantes células del sistema inmune (por ejemplo, las células T reguladoras) ³⁹. Sin embargo, aún no ha sido bien explorado el potencial uso de biomarcadores epigenéticos asociados con la AA.

En el futuro los estudios de esta enfermedad deberían incluir la investigación del estado de metilación del ADN como un patrón útil y de fácil obtención para medir las modificaciones epi-genéticas. Más aún, la metilación del ADN podría ser vista como un fenotipo ⁴⁰.

Hoy se afirma que las futuras investigaciones sobre la AA, tendrían que contemplar la influencia del tiempo de la exposición al alimento, la dosis, el tipo de dieta, la etnia, la exposición a microbios, a polutantes y al humo de cigarrillo; factores que inducirían cambios epi-genéticos en la expresión de los genes que alteran el “riesgo alérgico”. Algunos de estos factores ya han sido claramente implicados en estudios epidemiológicos de asma y en enfermedades alérgicas respiratorias ⁴¹.

Los nuevos estudios focalizados en conocer los mecanismos de estos efectos, podrían ayudar a determinar perfiles de riesgo para adquirir la enfermedad y alcanzar la prevención de la AA.

Identificación de fenotipos

Todo lo expuesto hasta aquí, dificulta la caracterización de fenotipos de AA (entendiéndose como tal a las características de presentación de la enfermedad como resultado de la interacción entre la predisposición genética y el ambiente). Esto, sin dudas, impide un óptimo abordaje clínico de la enfermedad.

Si bien los métodos diagnósticos para AA son útiles para demostrar reactividad al alimento, no proveen información para diferenciar fenotipos y los estudios realizados presentan marcadas diferencias étnicas y geográficas ⁴².

Resumiendo, los fenotipos clínicos de la ALV mediada por IgE son altamente heterogéneos y resultan de diferentes mecanismos inmunológicos, en donde el tipo y número de alérgenos alimentarios, podría ser un potencial factor de confusión para identificarlos, de allí que el comportamiento clínico de la enfermedad sea tan variado.

Al respecto, se sostiene que una mejor interpretación de los síntomas y de los estudios complementarios, sumado a estudios para predecir el desarrollo de la tolerancia oral, facilitará el diagnóstico ⁴³.

Estado actual del conocimiento

Los conocimientos ampliamente aceptados sobre alergia alimentaria señalan que:

- a) Su prevalencia ha aumentado rápidamente en los últimos años. A los doce meses de edad alcanza hasta el 8%, para luego descender durante la primera infancia al término de la cual permanece estable en 1-2%,
- b) La mayoría de las manifestaciones clínicas aparecen en los primeros 2 años de vida,
- c) La sospecha de su presencia es muy común en la temprana infancia,
- d) La patogenia aún permanece en estudio y todavía no se han identificado genes responsables,
- e) Entre los factores de riesgo sospechados, se incluyen: inmadurez de la barrera intestinal, aumento hereditario o no de la permeabilidad de la mucosa intestinal, deficiencia o producción tardía de IgA secretoria, inadecuado desafío del sistema inmune mucosal con la flora comensal, temprana introducción de alimentos sólidos, tendencia genética a respuestas TH2, polimorfismos de citoquinas TH2, o de genes del receptor IgE, alteración del sistema nervioso entérico, alteraciones inmunes como son los bajos niveles de TGF- β y algunas infecciones intestinales ^{44, 45, 46, 47, 48}.

Además, se considera que el correcto diagnóstico es primordial no sólo para un adecuado tratamiento, sino también para evitar la indicación de innecesarias dietas que deterioran el estado nutricional del paciente ⁴⁹.

Por otro lado, los métodos complementarios propuestos para predecir, prevenir y diagnosticar la alergia alimentaria, todavía se encuentran bajo rigurosa revisión, por lo que profundizar los estudios sobre ellos, resulta extremadamente importante, ya que esta enfermedad impacta severamente en la calidad de vida de los individuos que la padecen ^{50, 51, 52}.

Cabe destacar que la terminología referente a este tema, ha sido normatizada con el objeto de reducir la disparidad de criterios de estudio e interpretación y facilitar la investigación ⁵³.

Alergia a la leche de vaca

La leche de vaca es el alérgeno más frecuentemente observado como causa de alergia en el lactante. Su incidencia en niños es del 2 al 7.5% en países desarrollados donde predomina la práctica de la lactancia materna y del 5 al 12% o más en los países en vías de desarrollo ^{54, 55}.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes son gastrointestinales (vómitos, cólicos, diarrea) y/o dérmicas (eritema, urticaria, eczema, dermatitis atópica). Los síntomas respiratorios (tos persistente, asma y/o rinitis) son reportados como menos frecuentes. Se ha sugerido que el paso de la sensibilización alimentaria a la de alérgenos inhalantes, puede ocurrir en algunos niños antes de los de 4 años de edad y que la rinitis puede ser más común de lo que se reporta epidemiológicamente ⁵⁶.

La hipersensibilidad a las proteínas de la leche de vaca conforma un grupo de entidades clínico-patológicas con asiento único o no en el aparato digestivo que frecuentemente tienen en común una exagerada producción de IgE y el protagonismo de células TH2 (comprobables en casi el 60% de los casos).

También pueden ser responsables de la enfermedad las reacciones por inmunocomplejos, las citotóxicas y las mediadas por células ⁵⁷.

Los alérgenos principales de la leche de vaca se distribuyen entre el suero y fracciones de caseína. Los alérgenos de suero incluyen a: 1) Alfa-lactoalbúmina ALA (Bos d 4) PM 14,2 KD, su papel en la alergia a la leche es controvertido y los resultados de su prevalencia varían entre el 0 y el 80% de los pacientes que reaccionan a esta proteína; 2) Beta-lactoglobulina BLG (Bos d 5) PM 18,3 KD, la proteína más abundante del suero de la leche de vaca, pero no está presente en la leche humana. Trece a 76% de los pacientes reaccionan a esta proteína; 3) Albúmina de suero bovino (Bos d 6) involucrada en la alergia a la carne, ésta se reporta entre 0 y 88% de los eventos de sensibilización, mientras que los síntomas clínicos se producen hasta en el 20% de los pacientes. Las Inmunoglobulinas bovinas (Bos d 7) rara vez son responsables de los síntomas clínicos en alérgicos a la leche de vaca, mientras que las caseínas constituyen el 80% del total de proteínas de la leche de vaca y sus alergenos (conocidos colectivamente como Bos d 8) constan de 4 proteínas diferentes (alfa1, alfa2, con un

PM de 23,6 KD, beta con un PM 23,9 KD y kappa caseína con un PM de 19 KD) que comparten escasa homología secuencial. Sin embargo, la sensibilización simultánea a estas caseínas se observa con frecuencia ⁴².

Desafortunadamente, los resultados de las investigaciones sobre la historia natural de la alergia a la leche de vaca, no han provisto aún, de un cuadro claro y consistente.

Como consecuencia, el manejo del niño alérgico a la leche de vaca, permanece como un gran desafío para el médico tratante. Por lo tanto, indicar la supresión del alimento, genera gran preocupación en los padres y acarrea cierto riesgo para el estado nutricional del paciente.

Además, aunque la mayoría de los niños que tienen manifestaciones clínicas antes de los doce meses de vida, desarrollan tolerancia a la leche de vaca alrededor de los tres años de edad, en la práctica clínica, algunos niños sin dieta de exclusión estricta, pierden su sensibilización a la leche rápidamente (en algunos meses) mientras otros no alcanzan la tolerancia a pesar de ser sometidos a una eliminación alimentaria rigurosa.

Sin embargo, la oportuna exclusión de las proteínas lácteas, continúa siendo el tratamiento de elección para alcanzar, lo antes posible, la tolerancia inmunológica ⁵⁸.

En todos los casos, el desarrollo y la evolución de la alergia a la leche de vaca, es dependiente de la presencia de una serie de factores genotípicos y fenotípicos involucrados en la regulación de la permeabilidad intestinal y del tejido linfático asociado al intestino.

Estos factores serían responsables de su fisiopatogenia y de otros tipos de inflamación intestinal ⁵⁹.

Como se ha señalado anteriormente, el proceso de sensibilización resulta de una compleja interacción entre el individuo y el ambiente (bacterias, nutrientes y otros agentes). Así, el desarrollo de la homeostasis inmune de la mucosa intestinal parece depender: a) del establecimiento y composición de la flora comensal y b) de un adecuado tiempo-dosis de antígenos dietéticos, cuando estos son introducidos por primera vez ⁶⁰.

Por lo tanto, en la patogénesis de esta enfermedad, además de la predisposición genética, se debe considerar al alérgeno, a la barrera intestinal y a la respuesta inmunológica.

Nosotros focalizamos nuestro estudio en el inicio de la enfermedad, teniendo en cuenta que el concepto de “ventana de sensibilización” en las primeras etapas de la vida, se basa en estudios que evalúan el efecto que provoca la ingesta de leche de vaca en diferentes momentos de la infancia.

Se ha demostrado, desde hace ya tiempo, que la sensibilización es más probable cuanto más temprano se incluyen las proteínas lácteas en la dieta y que los procesos de digestión/absorción de antígenos alimentarios asociados al sistema inmunológico de mucosas muestran marcados cambios según el tipo de alimentación y el desarrollo del niño ^{61, 62}. Entonces, creemos que la edad del niño sería condicionante de la digestión y absorción de antígenos, de la respuesta inmune y de las manifestaciones clínicas.

Por lo anterior, tanto el tipo de alimentación recibida durante los primeros meses de la vida como la edad del lactante al tiempo en que comienzan las manifestaciones clínicas de hipersensibilidad a la leche de vaca (ya sean digestivas, dérmicas o respiratorias) parecen constituir fuerzas que dirigirán la marcha alérgica.

Por otra parte, es una preocupación actual el hecho de que la alergia a los alimentos se haya transformado en un problema de salud pública a nivel global.

Su incidencia ha aumentado en la última década más rápidamente de lo que permitirían los cambios en el genoma. Entonces cabe preguntarse: ¿cuáles son los factores ambientales que podrían interactuar con el riesgo adquirido genéticamente para desarrollar la enfermedad? ^{63, 64}. Algunos individuos poseen factores genéticos que confieren susceptibilidad o resistencia a una determinada patología en un entorno particular.

Al respecto, la historia familiar es un potente factor de riesgo para el desarrollo de la alergia a alimentos, aunque no parece ser el único. Hay buena evidencia proveniente de estudios en gemelos, que señalan la importancia de la variación genética, más aún cuando se asocia con otras enfermedades atópicas ^{65, 66, 67}.

La predisposición genética conduce a la producción de citocinas predominantemente Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 y IL-13) que contribuyen a la sensibilización alérgica, originada en defectos intrínsecos de células T o de células presentadoras de antígenos ⁶⁸.

Como se sabe, la alergia a la leche de vaca (ALV) es la principal causa de alergia alimentaria, afecta mayormente a los niños y no existe suficiente información referente a tendencias geográficas en su desarrollo.

En ese sentido, los genotipos asociados con la ALV son desconocidos (aún no han podido ser replicados en poblaciones independientes) y podrían ser responsables de la marcada variabilidad de la respuesta clínica individual a las proteínas lácteas ⁶⁹. Por eso, en la actualidad el riesgo de padecer ALV es definido de acuerdo a los antecedentes familiares ⁴².

La población humana ha acumulado un alto número de sustituciones de bases en el ADN mitocondrial (ADNmt) a lo largo de linajes maternos, en los cuales las combinaciones específicas constituyen los haplogrupos mitocondriales supuestos ⁷⁰.

Los haplogrupos ADNmt específicos para una población, pueden ser funcionalmente diferentes y ejercer influencias que podrían afectar los resultados de las enfermedades, ya sea exacerbando, retrasando o bien aminorando la sintomatología dada ^{71, 72, 73}.

Recientemente se ha comprobado que los niños de raza negra presentan mayor riesgo de ser sensibilizados a alérgenos alimentarios y a más de un alimento, cuando se los compara con niños caucásicos. Según este estudio, la ascendencia africana se asocia mayormente con sensibilización al maní ⁷⁴.

El avance en los estudios de secuenciación de la Región Hiper-variable uno (HVI) de la región D-Loop en el ADNmt ha revelado que la tasa de mutación es diferente a lo largo del segmento. Algunas posiciones de la Región HVI, son extremadamente variables entre los linajes, mientras que otras son relativamente constantes ⁷⁵.

Análisis de la diversidad genética

Durante la Edad de Hielo (43.0 -12.0 mil años), el subcontinente siberiano completo, se amplió enormemente en el noreste, debido a los menores niveles de los mares de Bering y Chukchi, creando así el refugio Beringia en la pieza de hielo que conecta Siberia y Alaska. Esto permitió las migraciones humanas en el nuevo mundo ^{76, 77}.

Siberia se encuentra al sur del Círculo Polar Ártico, lo que implica que las poblaciones tempranas de su extremo noreste, se extinguieron o se retiraron hacia el sur, o bien, que el medio ambiente y las condiciones del hábitat, hubieran cambiado y permitieron una repoblación del Ártico Siberiano ^{78, 79}.

La presencia de Beringia tendría implicancias importantes para la resolución de asentamiento humano inicial del extremo noroeste del nuevo mundo ^{80, 81}.

Los últimos habitantes del ex Beringia, el yukaghir, Chukchi, como los Esquimal-Aleutianos y los Indígenas Na-Dene, sería probable, probablemente sean sobrevivientes a los rápidos cambios ambientales que tuvieron lugar a finales del Pleistoceno/ temprano Holoceno. La presencia humana en el Monte Verde, sitio ubicado en el sur de América del Sur, cuestiona este modelo Clovis y genera la convocatoria de alternativas a la hipótesis. Debido a que la fecha más temprana para Monte Verde implica que el poblamiento de las Américas, al sur de Beringia, se produjo antes de que el corredor libre de hielo se formara, una primera migración a lo largo de la costa del Pacífico, puede haber sido una ruta viable ^{82, 83, 84}.

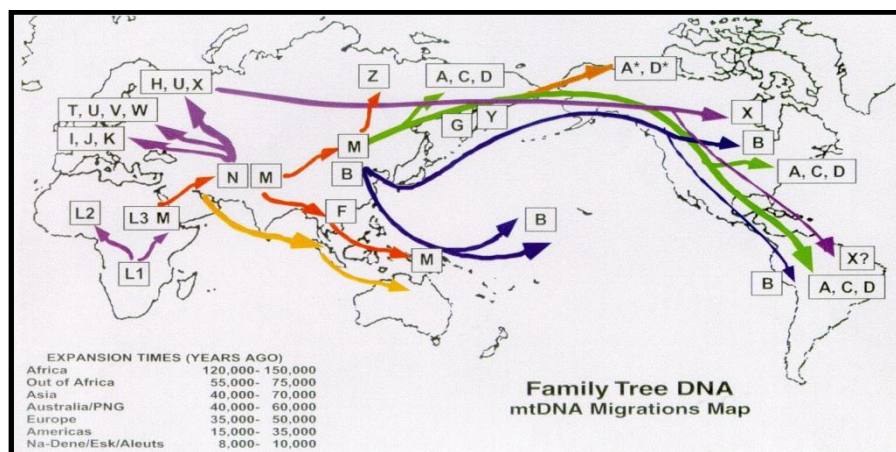
Una de las herramientas para estudiar y responder a estas teorías, el ADN de herencia materna mitocondrial (ADNmt), ha sido ampliamente utilizado para comprender la población de las Américas. Desde los primeros estudios, se ha encontrado que poblaciones nativas americanas existentes, presentan casi exclusivamente 5 haplogrupos en el ADNmt, clasificados como: A, B, C, D y X ⁸⁵.

Haplogrupos A-D se encuentran en todo el Nuevo Mundo y son frecuentes en Asia, con un origen noreste asiático de estos linajes ^{81, 83}. Estos haplogrupos, se utilizan para sugerir una sola migración como modelo ⁸⁴. Sin embargo, en algunos estudios, se encuentra un patrón diferente de diversificación y distribución del haplogrupo B,

llevando a algunos autores, a la hipótesis de que podría representar una posterior y separada migración de la llegada conjunta de los haplogrupos A, C, y D⁸⁶.

La historia del haplogrupo X es más difícil de alcanzar, ya que se encuentra en la actualidad en el Nuevo Mundo con una frecuencia relativamente baja y sólo en América del Norte, es raro en el Occidente Euroasiático y está casi ausente en Siberia⁸⁷.

Tras aplicar los tests de neutralidad de Tajima a la distribución de las variantes mitocondriales establecidas a partir de secuencias completas del ADNmt de los diferentes haplogrupos mundiales, individualmente y agrupándolos por continentes, el equipo de Douglas Wallace concluyó que mientras que los haplogrupos africanos, tanto en conjunto como individualmente, se ajustaban a un modelo de evolución neutral, los clusters europeos: M, N y sus derivados y los asiáticos: A, B, C, D, G, Z, Y, X se desviaban significativamente del modelo^{88, 89, 90}.



En el paisaje actual existente de nativos americanos ADNmt, la diversidad filogenética se compone de los mismos cinco grandes haplogrupos basales: AD + X, sin embargo, hoy se pueden distinguir nuevas secuencias fundadores en cada haplogrupo que suman diez monofiléticos sub-haplogrupos: A2, B2, C1b, C1c, C1d, C4c, D1, D2A, D3 y D4h3a^{86, 88, 89}.

La clasificación de los haplogrupos mitocondriales según las posiciones diagnóstico de la región control no es 100% exacta. Esto se debe esencialmente a dos fenómenos: la retromutación y la homoplasia.

Para la datación de los diferentes clusters se estima el tiempo del ancestro común más reciente (TMRCA, Time of the Most Recent Common Ancestor) de cuantas líneas lo integran. Para ello se consideran aquellos haplotipos relacionados, se calcula su diversidad y se estima el tiempo que ésta ha tardado en generarse con una tasa de mutación determinada.

La estima no se corresponde exactamente con el momento en que surgieron las mutaciones que caracterizan a dichos clusters, pues desde ese momento hasta la fijación de dichas mutaciones en las líneas descendientes puede haber transcurrido mucho tiempo. Por otra parte, la estima del TMRCA se basa en aquellos haplotipos derivados del linaje original. Muchos de los descendientes de este MRCA pueden haberse extinguido por procesos de deriva genética por lo que el tiempo estimado puede ser menor al real. Entre las medidas de diversidad más empleadas para calcular el TMRCA está el estadístico U (Rho). La datación mediante este estadístico requiere de la reconstrucción filogenética entre los haplotipos que conforman un cluster determinado, habitualmente en forma de Median Networks o Median Joining Networks.

El estadístico U representa el número medio de cambios mutacionales entre el haplotipo original (root = raíz) y los haplotipos individuales de la muestra. Estos cambios se estiman a partir del Network, puesto que éste tiene en cuenta las reversiones y paralelismos en los sitios hipermutables.

Puede calcularse un error estándar de cada fecha en base al número de haplotipos muestreados y a la subestructura de las ramas^{91,92}.

OBJETIVOS

Valorar la influencia en el desarrollo de la alergia a la leche de vaca de factores tales como la edad y características de las manifestaciones clínicas al inicio de la enfermedad, el tipo de alimentación recibida durante los primeros 3 meses de vida, la presencia de antecedentes familiares de alergia y la exposición ambiental.

Elaborar índices predictivos de riesgo para alergia a la leche de vaca que puedan ser obtenidos fácilmente en la práctica clínica pediátrica diaria y permitan realizar un diagnóstico precoz de la patología.

Estudiar la influencia de haplogrupos mitocondriales en un grupo de niños ALV, caracterizando haplogrupos de la Región D-Loop del ADN mitocondrial con el fin de arribar a un mejor conocimiento de la herencia biológica y genética en la etiología de la enfermedad.

Capítulo II

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño y población

Se realizó un análisis observacional y retrospectivo de historias clínicas, tomadas al azar, de 91 niños con diagnóstico de ALV y 91 controles de ambos sexos, menores de 6 años de edad.

Lugar de realización

Todos los pacientes provenían de zonas urbanas y suburbanas de la ciudad de Río Cuarto y fueron asistidos en el Servicio de Alergia del Hospital San Antonio de Padua en el período 1991-2003.

Criterios de inclusión y de exclusión

Se incluyeron los casos cuyo diagnóstico se haya basado en una prueba de provocación oral positiva.

Se excluyeron aquellos niños que tenían alguna patología sistémica y aquellos cuyas madres hubieran estado bajo dieta restrictiva o algún tipo de control ambiental durante el embarazo y/o la lactancia.

Criterios metodológicos

Los pacientes fueron agrupados teniendo en cuenta el tipo de alimento recibido hasta los 3 meses de edad en: 1) grupo F (alimentados con fórmulas a base de leche de vaca), 2) grupo P (alimentados exclusivamente con pecho materno) y 3) grupo M (alimentados con fórmulas a base de leche de vaca y con pecho materno).

Definición de las variables

Para cada paciente se registraron: a) la edad (en meses) en la que se presentan los primeros síntomas, b) la existencia o no de historia familiar de enfermedades con base atópica (rinitis, asma, eczema), tanto para el padre como para la madre, c) si hubo exposición al humo de cigarrillo, d) la ausencia o presencia de diarrea, vómitos, cólicos, eritema, urticaria, dermatitis alérgica eccematosa, asma y/o rinitis y e) la categorización positiva o negativa, en función de la ratificación o no de la

etiología, luego de excluir de la dieta a la leche de vaca por un lapso de 14 días y reintroducirla (prueba de provocación o desafío oral abierto).

Análisis estadístico

Se efectuó un análisis estadístico descriptivo de todas las variables consideradas en el estudio; las continuas se resumieron como media \pm desviación estándar y mediana con rango intercuartílico, y las categóricas como porcentajes.

Para determinar la relación de cada factor con el diagnóstico, se realizaron análisis bivariados a través de la prueba chi-cuadrado (χ^2) de independencia, cálculo de Odds Ratio (OR), contrastes para diferencias de medias paramétrico (test t para muestras independientes) y no-paramétricos (pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Mann-Whitney), según fuera apropiado.

Las técnicas multivariadas de análisis de correspondencias múltiples y Regresión Logística se emplearon para el estudio de los factores que inciden de manera conjunta en la probabilidad de ser ALV y posterior determinación de perfiles clínicos.

Además, se elaboraron tres índices predictivos de riesgo de alergia a leche de vaca basados en la ponderación de cada factor según los OR individuales, los correspondientes a la Regresión Logística y en la identificación de criterios mayores y menores. La efectividad diagnóstica de cada uno se evaluó mediante el área bajo la curva ROC, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

Para los contrastes se consideró un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$) y un 95% de confianza para la construcción de los intervalos informados (IC).

En el procesamiento de datos y obtención de los resultados empleados en el análisis estadístico, se utilizaron diferentes programas (software) específicos disponibles.

Además, se estudiaron 41 niños de 0 a 2 años de edad y de ambos sexos, que viven en la ciudad de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Once (11) de ellos tenían diagnóstico de ALV y treinta (30) individuos sanos conformaron el grupo control. Las muestras sanguíneas obtenidas de esta población, previo consentimiento informado, fueron utilizadas para el análisis del ADN mitocondrial.

El diagnóstico, se confirmó en todos los pacientes, luego de dos semanas de exclusión del alimento, por medio del desafío oral abierto atendiendo a dos razones prácticas: 1) corta edad de los niños y 2) baja sensibilidad de las pruebas diagnósticas para ALV en lactantes menores de 1 año de edad.

Los niños ALV (n=11) se dividieron de acuerdo al tipo de manifestaciones clínicas con que iniciaron la enfermedad en: a) Dermatitis atópica (DA) + Enfermedad Gastrointestinal (EGI) (n: 6 casos) y (b) Rinitis y Asma (n: 5 casos).

Análisis de mutaciones o variantes en la región D-Loop del genoma mitocondrial

La región D-Loop HVI, II y III del genoma mitocondrial, fue amplificada por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los “*primers*” utilizados fueron: Fw 16033 a 16055 y Rev. 50 a 29 (RHVI); Fw 29 a 51 y Rev. 713 a 693 (RHVII y III). Las condiciones de la mezcla de incubación, para amplificar los productos en la PCR, tenían una temperatura de *annealing* (para los diferentes segmentos) en un rango de 56°C a 58°C.

Posteriormente se realizó electroforesis en geles de agarosa al 2%, para la visualización de las bandas de ADN, con luz UV. Cada fragmento fue purificado y mandado a secuenciar para su análisis (dos determinaciones).

Los resultados fueron comparados con la puesta del Consenso de la secuencia de Cambridge (GenBank Accession No.: NC_012920.1).

Análisis filogenéticos

La filogeografía se encarga del estudio de la distribución geográfica de los distintos linajes mitocondriales. Mediante la integración de la información genética y su localización geográfica se ha intentado evaluar el impacto de determinados

procesos históricos sobre la diversidad genética actual. La antropología genética investiga las causas de la variación genética humana en el presente y la historia evolutiva que la ha generado ⁹³.

La cantidad y naturaleza de la diversidad genética en los humanos modernos proporciona valiosa información acerca de nuestra historia evolutiva. Sin embargo, generalmente resulta difícil determinar el origen de la diversidad en esas poblaciones. Esto puede deberse a que sus culturas se han integrado a otras sociedades, resultando en un perfil genético indistinguible del "pool" génico general o bien, como ocurrió en América, la pérdida de variabilidad como consecuencia de la Conquista y sus secuelas: guerra, esclavitud, hambre y epidemias.

La población humana actual de Argentina y de Latinoamérica en general es el resultado de cinco siglos de contacto entre los nativos americanos y las poblaciones migrantes, principalmente de Europa y África.

Los análisis de secuencias y los análisis filogenéticos son herramientas muy eficaces en el estudio de las especies de cualquier fila. Los árboles filogenéticos dan con gran precisión datos importantes para el trabajo de ecología de poblaciones y conservación de especies, ya que ayuda a determinar individuos o grupos emparentados inter-específicamente y en ciertas ocasiones, se puede obtener una distancia evolutiva que suele ser utilizada para elucidar hechos del pasado que han marcado la historia de los animales en cuestión ^{94, 95}.

Una de las metas de los estudios en biodiversidad es el entendimiento de los procesos de coexistencia entre las especies a distintas escalas espaciales y temporales. Los métodos de alineamiento progresivo, producen un árbol filogenético porque incorporan las secuencias nuevas, en el alineamiento calculado por orden de distancia genética.

El problema básico en la filogenia basada en morfología es la construcción de una matriz matemática que contenga valores representativos de cada una de las características fenotípicas usadas como clasificador para cada uno de los taxones (pacientes) en estudio. Los métodos de análisis filogenético mediante matriz de distancias descansan de forma explícita en una medición de la "distancia genética"

entre las secuencias en estudio, y por ello requieren un alineamiento múltiple como información de entrada. A menudo se define la distancia como la fracción de desajustes en las posiciones alineadas, con los gaps en el alineamiento, las regiones de apareamiento vacías (no marcadas por asterisco), que señalan región que no se aparea, ignorados o contados como desajustes⁹⁶, Figura 1.

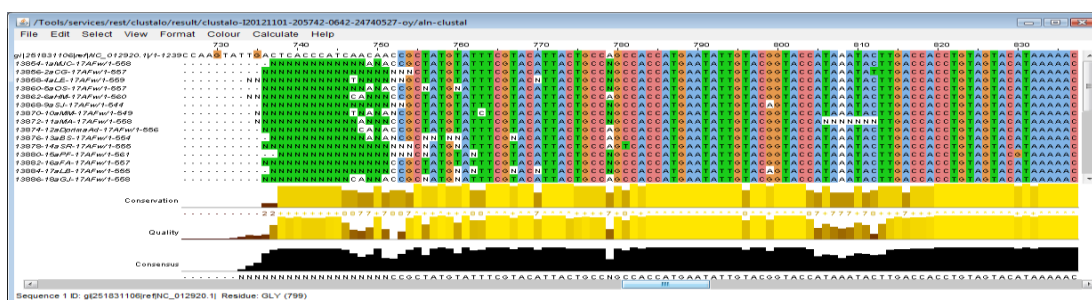


Figura 1. Alineamiento parcial de la región hipervariable uno (HVI) en la población estudiada.

Los métodos de distancia procuran construir una matriz completa de correspondencias y describir las distancias existentes entre cada par de secuencias. A partir de esta matriz, se construye un árbol filogenético que sitúa dentro del mismo nodo interior las secuencias cercanamente relacionadas y cuya longitud de ramas representa las distancias observadas.

Los métodos de neighbor-joining ("reunión por vecindad") emplean técnicas generales de aglomeración de datos para el análisis de secuencias y se sirven de la distancia genética como un medidor de aglomeración. Por otra parte, la taxonomía clásica, siempre está entrando en debates ya que suelen ser caracteres morfológicos los que se toman en cuenta en esta actividad, base de toda futura investigación en seres vivos. Surge entonces, la necesidad de utilizar técnicas moleculares, ya que al estar basadas en el genoma, dan una mayor exactitud en todos estos estudios⁹⁷.

Construcción del árbol filogenético

Un árbol filogenético o árbol de la evolución es un diagrama de ramificación o "árbol" que muestra las relaciones evolutivas entre diversas especies biológicas inferidos u otras entidades en base a similitudes y diferencias en las características de su físico y / o genéticos. Los taxones que se unieron en el árbol están implícitos que descienden de un antepasado común.

En un árbol filogenético enraizado, cada nodo con los descendientes representa el ancestro común más reciente, y las longitudes del brazo o rama en algunos árboles pueden interpretarse como estimaciones de tiempo. Cada nodo se denomina una unidad taxonómica. Los nodos internos son generalmente llamados unidades hipotéticas taxonómicas (UHT), ya que no puede ser observado directamente.

Los árboles son útiles en los campos de la biología, como la bioinformática, la sistemática y filogenia comparativos. Charles Darwin (1859) también produjo una de las primeras ilustraciones y crucialmente popularizó la noción de una evolución "árbol" en su libro seminal "El Origen de las Especies", Figura 2.

Más de un siglo más tarde, los biólogos evolucionistas siguen utilizando diagramas de árbol para representar la evolución, porque tales diagramas efectivamente pueden transmitir el concepto de que la especiación se produce a través de la división adaptativa y aleatoria de los linajes. Con el tiempo, la clasificación de las especies se ha vuelto menos estática y más dinámica^{98, 99}.

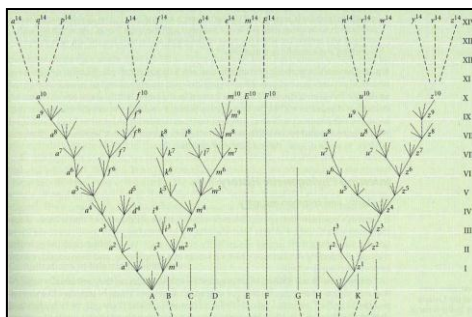


Figura 2. Grado de divergencia de las especies (Darwin 1859).

Árbol con raíz

Un árbol filogenético enraizado es un árbol dirigido con un nodo único (correspondiente a los antepasados generalmente imputados) más común y reciente de todas las entidades en las hojas del árbol. El método más común para los árboles de enraizamiento es el uso de un grupo externo controvertido, lo suficientemente cerca para permitir la inferencia de datos de secuencia o rasgos, pero lo suficientemente lejos para ser un grupo externo evidente.

Árbol sin raíz

Árboles sin enraizar ilustran la relación de los nodos de hoja sin hacer suposiciones acerca de los ancestros en absoluto. Mientras que los árboles sin raíces siempre puede ser generados a partir de las raíces simplemente omitiendo la raíz, una raíz no se puede deducir a partir de un árbol sin raíz sin algunos medios de identificación de ascendencia; esto se hace normalmente mediante la inclusión de un grupo externo en los datos de entrada o introducción de supuestos adicionales sobre la tasas relativas de evolución en cada rama, como una aplicación de la hipótesis de reloj molecular. Ambos árboles filogenéticos con raíz y sin raíz, pueden además ser bifurcados o multifurcados, y marcados o no marcados.

Ahora bien, si un árbol se bifurca tiene exactamente dos descendientes derivados de cada nodo interior (es decir, que forma un árbol binario), y un árbol de bifurcación sin raíz toma la forma de un árbol binario sin raíz, un árbol libre con exactamente tres vecinos en cada nodo interno. En contraste, un árbol multifurcado con raíces pueden tener más de dos hijos en algunos nodos y un árbol multifurcado sin raíz puede tener más de tres vecinos en algunos nodos.

Un árbol de marcado tiene valores específicos asignados a sus hojas, mientras que un árbol no marcado, a veces llamado una forma del árbol, define una topología única.

El número de árboles posibles para un número dado de nodos de hoja depende del tipo específico de árbol, pero siempre hay más multifurcados que los árboles

que divergen, más marcados que los árboles no marcados, y más arraigados que los árboles sin raíces.

La última distinción es la más biológicamente relevante, debido a que hay muchos lugares en un árbol sin raíz para poner la raíz.

Para los árboles marcados y bifurcados, se encuentran:

Para N taxones con raíz

$$3 \times 5 \times 7 \times \dots \times (2N-3) = (2N-3)!$$

Para N taxones sin raíz

$$3 \times 5 \times 7 \times \dots \times (2N-5) = (2N-5)!$$

$$(2n - 3)!! = \frac{(2n-3)!}{2^{n-2}(n-2)!}, \text{ para } n \geq 2$$

Denominaciones básicas

Un dendrograma es un término amplio para la representación esquemática de un árbol filogenético.

Un cladograma es un árbol filogenético formado usando métodos cladísticos. Este tipo de árbol sólo representa un patrón de ramificación, es decir, las longitudes de sus ramas no representan el tiempo o cantidad relativa de cambio de carácter.

Un filograma es un árbol filogenético que tiene longitudes de rama proporcional a la cantidad de cambio de carácter.

Un cronograma es un árbol filogenético que representa explícitamente el tiempo evolutivo a través de longitudes de las ramas.

Corriente fenética

En la bioinformática, Neighbor joining permite la creación de árboles fenéticos (fenogramas). Por lo general se utiliza para árboles sobre la base de datos de ADN o de proteína de secuencia, el algoritmo requiere el conocimiento de la distancia entre cada par de taxones (por ejemplo, especies o secuencias).

Para formar el árbol Neighbor joining, se toma como entrada una matriz de distancia especificando la distancia entre cada par de taxones.

Descripción del algoritmo utilizado en la investigación de haplogrupos

El algoritmo comienza con un árbol completamente sin resolver, cuya topología corresponde a la de una red en estrella, y se repite en los siguientes pasos hasta que el árbol está completamente resuelto. Todas las longitudes de rama conocidas son:

1. Sobre la base de la matriz de distancia actual, calcular la matriz Q (definida a continuación).

En nuestro trabajo el genoma mitocondrial (region D-Loop RHV I, II y III) sería una matriz con quien se comparó cada matriz de la RHV I, II y III de cada paciente:

$a_{11}a_{12}a_{13}$

$a_{21}a_{22}a_{23}$

$a_{31}a_{32}a_{33}$

Fila 1= Genoma Mitocondrial

Fila 2, 3, 4, 5.....41 Pacientes

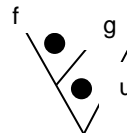
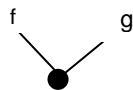
a_{ij} ;

$a = a: A, G, T \text{ o } C$ (nucleotides)

$i = \text{fila}; j = \text{columna},$

2. Encuentra el par de taxa para los cuales $Q(i, j)$ tiene su valor más bajo. Añadir un nuevo nodo en el árbol, uniéndose a estos taxones para el resto del árbol.

En la figura de la derecha, f y g están unidas al árbol por el nodo u nuevo.



3. Calcular la distancia desde cada uno de los taxones en el par de este nuevo nodo.
4. Calcular la distancia desde cada uno de los taxones fuera de este par, al nuevo nodo.

5. Iniciar el algoritmo nuevo, substituyendo el par de vecinos unidos con el nuevo nodo y el uso de las distancias calculadas en el paso anterior.

Q-matrix:

Sobre la base de una matriz de distancia relativa de los r taxones, calcular Q de la siguiente manera:

$$Q(i, j) = (r - 2)d(i, j) - \sum_{k=1}^r d(i, k) - \sum_{k=1}^r d(j, k)$$

Donde $d(i, j)$ es la distancia entre taxones i y j . Cada taxon un paciente.

Distancia de los miembros del par, al nuevo nodo:

Para cada neighbor de la pareja que se acaba de unir, se utiliza la siguiente fórmula para calcular la distancia al nodo nuevo.

Taxa f y g son los pares de taxones vinculado y u está en el nodo recién generado:

$$d(f, u) = \frac{1}{2}d(f, g) + \frac{1}{2(r - 2)} \left[\sum_{k=1}^r d(f, k) - \sum_{k=1}^r d(g, k) \right]$$

Y, por reflexión:

$$d(g, u) = d(f, g) - d(f, u)$$

Distancia de los otros taxa para el nuevo nodo:

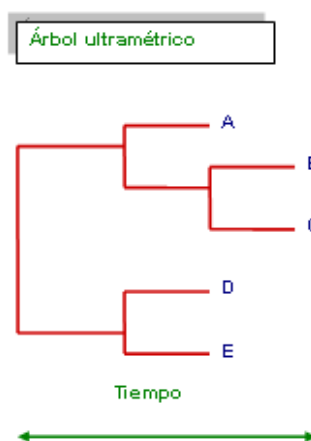
Para cada taxón no se considera en el paso anterior, se calcula la distancia hasta el nodo nuevo de la siguiente manera:

$$d(u, k) = \frac{1}{2}[d(f, k) + d(g, k) - d(f, g)]$$

dónde u es el nuevo nodo, k es el nodo para el que se desea calcular la distancia f y g son los miembros de la pareja que se acaba de unir.

Complejidad

Neighbor joining en un conjunto de r taxones que requiere $r - 3$ iteraciones. En cada paso se tiene que construir y buscar en una Q matriz. Inicialmente, la Q matriz es el tamaño $r \times r$, entonces el siguiente paso es, $(r - 1) \times (r - 1)$ etc. Esto, conduce a un algoritmo con una complejidad de tiempo de $O(r^3)$.



Ventajas

- Los cálculos realizados sobre los datos (matriz de distancias) son simples, lo que contribuye a que el método sea computacionalmente rápido, su complejidad es $O(n^3)$.
- Es comparativamente rápido con respecto a otros métodos de análisis filogenético.

Desventajas

- a) Da como resultado un único posible árbol.
- b) No considera ancestros intermedios entre los nodos existentes.
- c) Las secuencias no son consideradas como tales, sino que se trabaja con la matriz de distancias lo que puede causar pérdida de información.

Caracterización filogenética de la población estudiada

Utilizando del Programa CLUSTAL OMEGA, el Neighbour joining tree using Blosum62, se construyó el árbol filogenético de la muestra estudiada: población de casos y controles de la ciudad de Río Cuarto, Córdoba, Argentina, Figura 3.



Figura 3. Ubicación geográfica de la ciudad de Río Cuarto, Córdoba, Argentina (200 Km al sur de la capital de la provincia).

En el mismo se observa cómo las variantes de la región HVI, se distribuyen acercándose o alejándose del GMT, desde abajo hacia arriba, Figura 4 y 5.

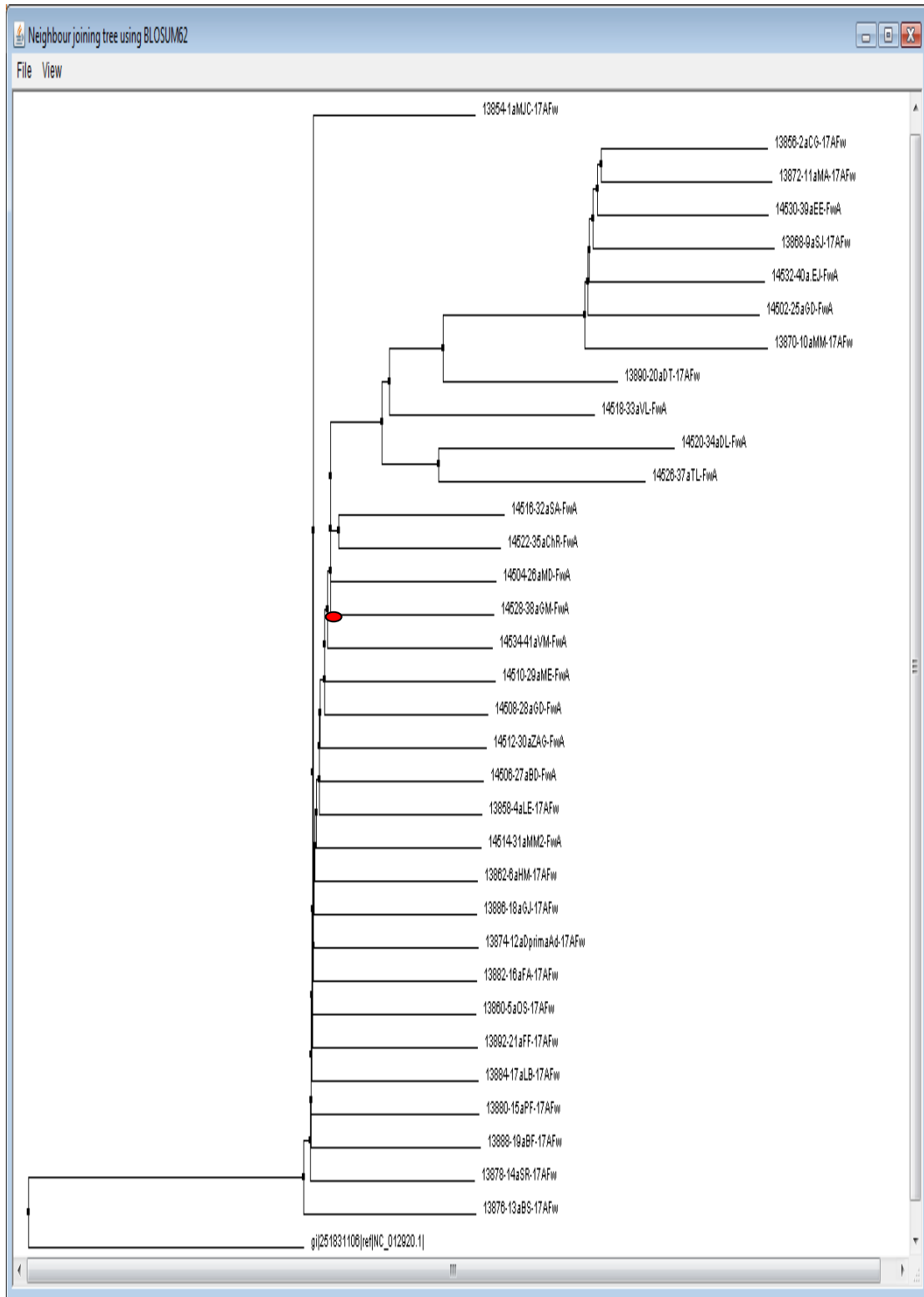


Figura 4. Árbol filogenético de la región hipervariable uno (HVI) de la población estudiada.

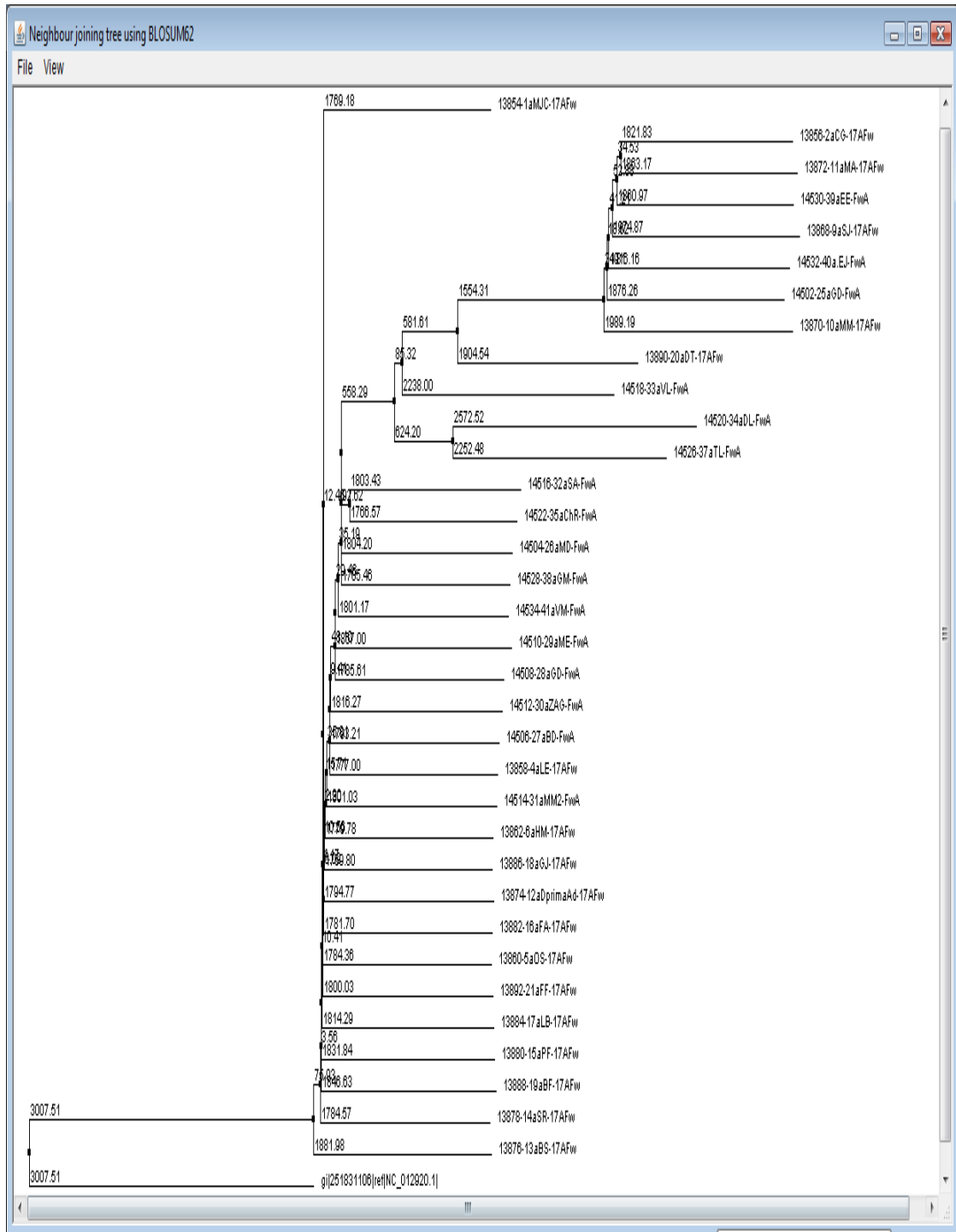


Figura 5. Árbol filogenético que marca las distancias de la región hipervariable uno (HVI), producto del recalcado de la distancia.

Pasos para la construcción del árbol filogenético

Paso 1: Crear la matriz de distancia.

En el siguiente ejemplo se muestra el cálculo de la matriz de distancias, de acuerdo a la implementación propuesta y la generación del árbol a partir de esta:

Sea nuestro ejemplo OTUs (Unidad Taxonómica Operativa) y taxón: cada paciente.

O T U s	AGTAGTTC	Genoma mitocondrial
	AGTAGTTA	Taxón 1
	AGTAGTAA	Taxón 2
	AGTAGGGG	Taxon 3.....41

1. AGTAGTTC

2. AGTAGTTA

$$Dis. 1,2 = \frac{1}{8} 0.125$$

Luego se repite: 1, 3; 1, 4 etc.

1. AGTAGTTC

3. AGTAGTTA

$$Dis. 1,3 = \frac{2}{8} 0,25$$

Matriz de distancia por distancia de Hamming

OTU	1	2	3	4	5
1	0	0.125	0.25	0.375	0.25
2	0.125	0	0.125	0.375	0.375
3	0.25	0.125	0	0.375	0.375
4	0.375	0.375	0.375	0	0.125
5	0.25	0.375	0.375	0.125	0

Aplicando la fórmula de Tajima se obtiene la siguiente matriz:

OTU	1	2	3	4	5
1	0	0.875	1.375	1.7453	1.375
2	0.875	0	0.875	1.7453	1.7453
3	1.375	0.875	0	1.7453	1.7453
4	1.7453	1.7453	1.7453	0	0.875
5	1.375	1.7453	1.7453	0.875	0

Paso 2: Hallar la menor distancia en la matriz.

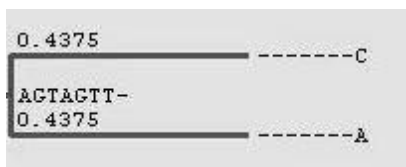
Menor distancia: (0.875) 2,1 o 1,2 (distancia).

Paso 3: Unir las Otus con menor distancia.

Unir las Otus 1 y 2. Y calcular su distancia:

$$distancia = Dist. \frac{1,2}{2} = \frac{0,875}{2} = 4375.0$$

Subárbol resultante de unir OTUS 1 y 2



Se repite tantas veces como datos tenga la matriz, recalculando la distancia.

Del árbol obtenido luego de entrada los datos en el Programa Clustal Omega, se obtuvo la siguiente alineación, en la parte superior están los datos matriz del GMT, luego cada matriz de cada paciente alineado de las regiones HVII y III, Figura 6.

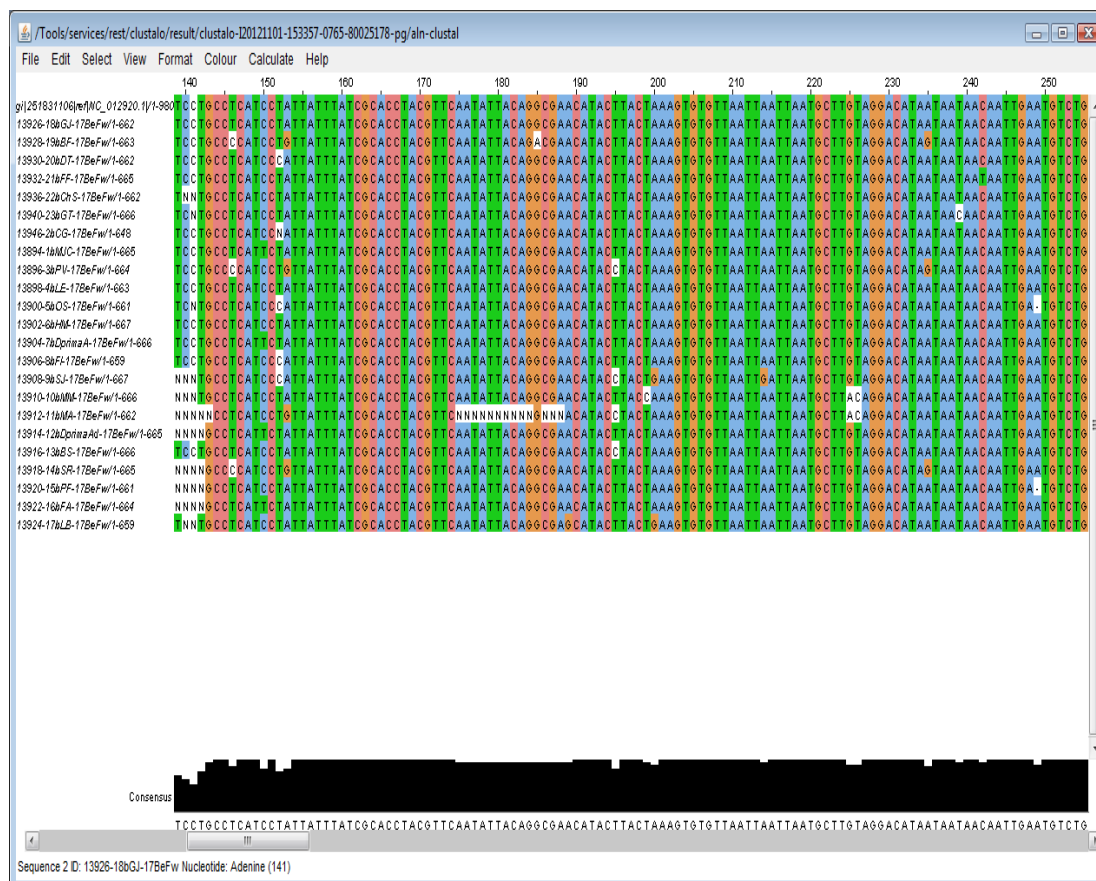


Figura 6. Alineamiento parcial de la región hipervariable dos y tres (HVII-III).

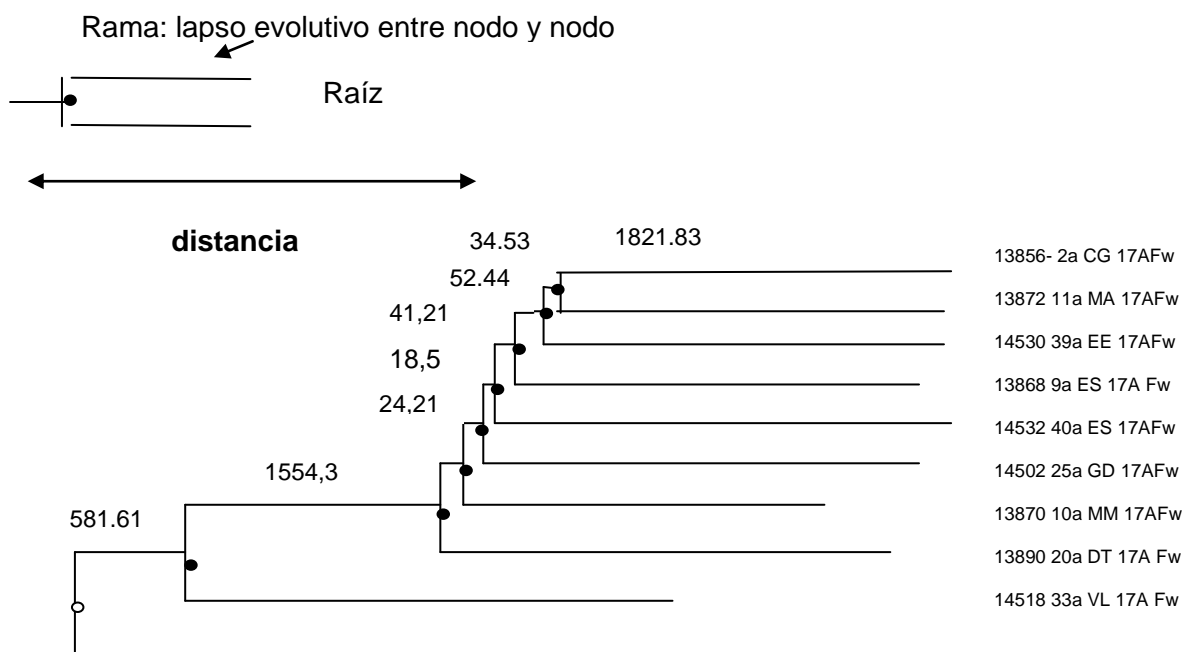
Luego se realizaron los correspondientes cálculos de distancia y peso utilizando también el programa de Clustal Omega Neighbour joining Blosum62.

Para estudiar nuestra población, se siguió el procedimiento descrito a continuación:

El árbol usado para guía del proceso de múltiple alineamiento final, se calculó de la distancia matriz del paso 1, usando Neighbour Joining method.

- Nodo, antepasado más reciente

13856- 2a CG 17AFw Hoja (paciente)



La distancia se calculó de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 & \text{Peso de Secuencia } I \\
 = & 1821.83 + \frac{34.53}{2} + \frac{52.88}{3} + \frac{41.21}{4} + \frac{18.52}{5} + \frac{24.91}{6} + \frac{1554.31}{7} \\
 & + \frac{581.61}{8} + \dots
 \end{aligned}$$

Se habla de peso, porque el cambio de un nucleótido por otro cambia el Peso Molecular, como no estamos en una región codificante (es la Región intron: Control D-Loop), no se habla de cambio de peso molecular de un aminoácido. Este árbol indica qué pacientes o controles se alejan más del GMT, visto de abajo hacia arriba.

El paciente 13 a BS, es el más próximo al GMT, el 2a CG el más alejado, y 1a MJC, está ancestrado con el GMT y con 13a BS, pero se aleja ancestralmente de los otros.

Sin embargo, el árbol dibujado para la región HVII y III, no refleja lo mismo, pero sí lo hace para 2b CG. Esto demuestra los cambios sufridos en el tiempo para ciertas variables (cambios nucleotídicos). Las variantes de la región HVII y III, en los pacientes 2b CG y 17b LB, estarían emparentadas, cercanas al GMT, pero ancestralmente distante de los otros pacientes, Figura 7.

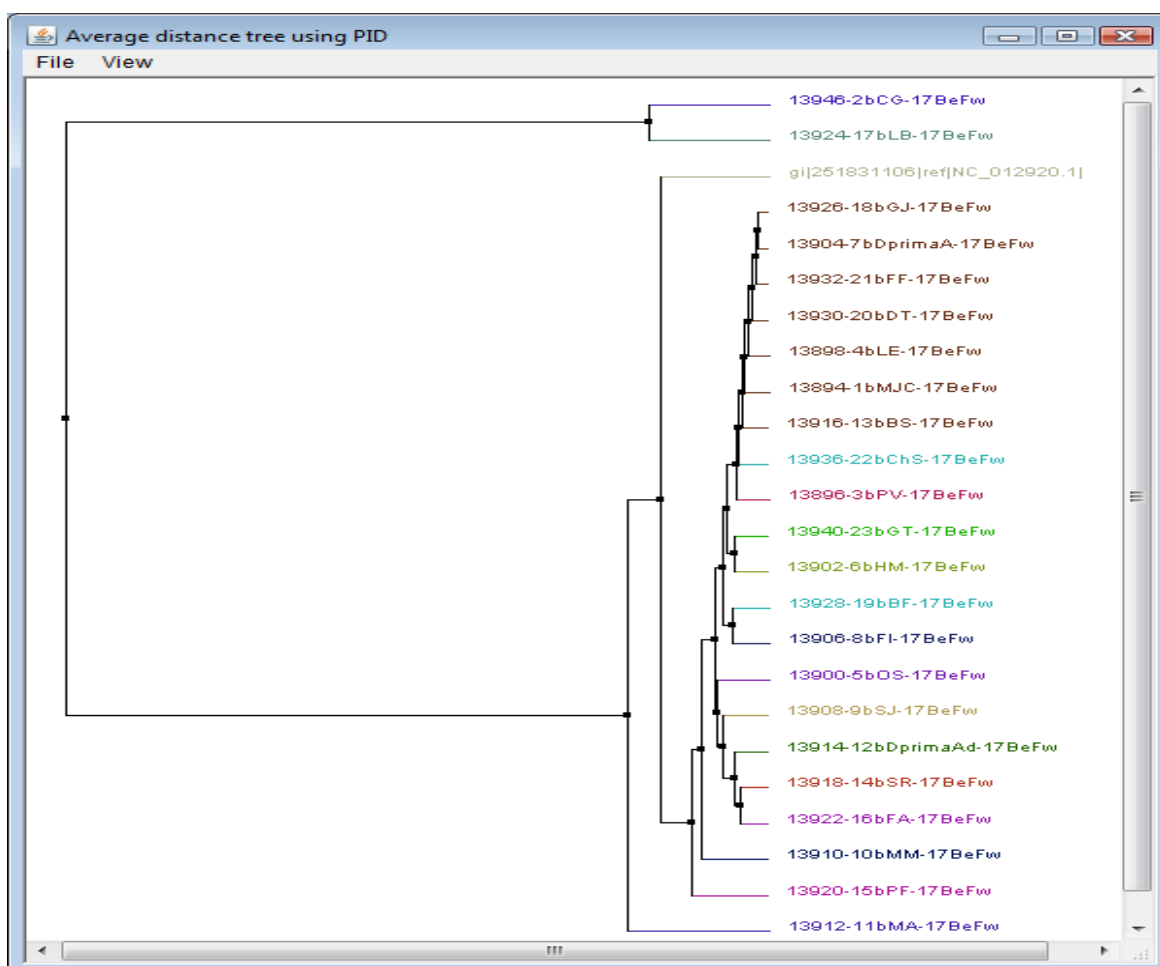


Figura 7. Árbol filogenético de la región HVII y HVIII en la población estudiada.

Detalle de los cálculos efectuados en el análisis estadístico.

Se aplicó el método científico χ^2 , con una hipótesis nula (H0): los haplogrupos no influyen en la enfermedad.

HAPLOGRUPO	Controles	ALV*	Total
Europeo	a1= 21	a2 = 9	NA = 30
Asia - Europeo	b1 = 5	b2 = 0	NB = 5
Asia - Americano	c1 = 3	c2 = 2	NC = 5
Africano	d1 = 1	d2 = 0	ND = 1
Sub-Total	N1 = 30	N2 = 11	N = 41

*Alérgicos a la leche de vaca

$$\chi^2 = \frac{41}{30} \left[\frac{21^2}{30} + \frac{9^2}{11} \right] + \frac{41}{5} \left[\frac{5^2}{30} + \frac{0}{11} \right] + \frac{41}{5} \left[\frac{3^2}{30} + \frac{2^2}{11} \right] + \frac{41}{1} \left[\frac{1^2}{30} + \frac{0}{11} \right] - 41$$

$$\therefore \chi^2 = 2,79 \text{ de la muestra}$$

(Grado de libertad)= 3

$$\text{coeficiente de contingencia } C = \sqrt{\frac{2,79}{2,79 + 41}} = 0.25$$

El grado de asociación de haplogrupos con la población enferma es mínimo, no significativo.

Por lo tanto, para un nivel de significación del 5% y 3 grados de libertad, se obtiene que el valor de χ^2 de la muestra, es menor que el valor crítico de 7.81, por lo que puede concluirse que no podemos rechazar H_0 (hipótesis nula), es decir, los haplogrupos en la población estudiada no influirían en el desarrollo de la enfermedad.

En la tabla 1, se identifica la variante T16519C, que no está descrita en (www.mitomap.org; www.genpat.uu.se/mtDB/), pero que en nuestros pacientes tuvo alta prevalencia.

Para conocer su asociación con variantes de haplogrupos definidos y con pacientes ALV, y obtener una proyección, se aplicó también el método científico χ^2 :

Cálculo del χ^2

$$\begin{aligned}\chi^2 &= \frac{14}{3} \left[\frac{1^2}{8} + \frac{2^2}{6} \right] + \frac{14}{1} \left[\frac{0}{8} + \frac{1}{6} \right] + \frac{14}{1} \left[\frac{0}{8} + \frac{1}{6} \right] + \frac{14}{2} \left[\frac{1}{8} + \frac{1}{6} \right] + \frac{14}{3} \left[\frac{3^2}{8} + \frac{0}{6} \right] \\ &\quad + \frac{14}{3} \left[\frac{2^2}{8} + \frac{1}{6} \right] + \frac{14}{1} \left[\frac{1^2}{8} + \frac{0}{6} \right] - 14 \\ \chi^2 &= 6.5\end{aligned}$$

Dado que el 42,8% de los pacientes que tienen la mutación son ALV ($P=6/14=0,428$), los límites de confianza 95% para la población son ($p=6/41=0.146$), es decir la probabilidad de enfermarse teniendo la mutación, para seis grados de libertad $X=6$ es:

$$\chi^2_{0.025} = 1.24; \quad \chi^2_{0.975} = 14.4.$$

Como $\chi^2=6.5$ está dentro del rango de los límites de confianza 95%, lo que sugiere que la probabilidad de padecer ALV teniendo la mutación o variante T16519C, existe.

Capítulo III
RESULTADOS

Se estudiaron 182 pacientes, con 86 niñas (47%) y 96 niños (53%). Además se separaron en: ALV 91 casos, con 58% varones y Controles 91 casos con mayor proporción de mujeres (53%). El género no resultó un factor significativo en el diagnóstico de ALV ($p=0,138$), Tabla1.

Tabla 1. Distribución del género según el grupo de pertenencia

Género	Grupo		Total
	ALV	Controles	
	n	n	
Varón	53	43	86
Mujer	38	48	96
Total	91	91	182

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos. **Prueba chi-cuadrado** para la asociación entre grupo de pertenencia y el género no significativa ($p=0,138$); Coeficiente de contingencia =0,109. **Estimación de Riesgo** de ser ALV entre varones y mujeres OR=1,557; IC_{95%} (0,867; 2,796).

La mayoría de los niños del grupo ALV recibieron alimentación mixta (M) 54%, seguida de alimentación materna exclusiva (P) 32%, mientras los controles recibieron mayoritariamente P (45%), seguida de M (40%).

Para ambos grupos la proporción de pacientes que recibió fórmulas a base de leche de vaca (F) fue la más baja 14% y 15% respectivamente, Tabla 2.

Tabla 2. Tipo de alimentación recibida según el grupo de pertenencia

Tipo de alimentación	Grupo		Total
	ALV	Controles	
	n	n	
Pecho	29	41	70
Fórmula	13	14	27
Mixta	49	36	85
Total	91	91	182

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos. **Prueba chi-cuadrado** para la asociación entre grupo de pertenencia y tipo de alimentación no significativa ($p=0,130$); Coeficiente de contingencia =0,148.

Si bien no se observó una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de alimentación y el diagnóstico ($p=0,130$), al reagrupar las categorías en P vs. F/M (nueva categoría compuesta por aquellos niños que cuya alimentación no fue exclusivamente con pecho, sino en base a fórmula o bien mixta) se encontró una asociación significativa al 7% ($p=0,067$), y además, se pudo estimar que un niño alimentado con fórmula o alimentación mixta tiene 75% más de chances de ser ALV que uno que sólo se alimentó con el pecho materno ($OR=1,75$), Tabla 3.

Tabla 3. Alimentación materna exclusiva (Pecho) vs. Fórmula o Mixta según grupo de pertenencia

Tipo de alimentación	Grupo		Total
	ALV	Controles	
	n	n	
Pecho	29	41	70
Fórmula o mixta	62	50	112
Total	91	91	182

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos; **Prueba chi-cuadrado** para la asociación entre grupo de pertenencia y tipo de alimentación significativa al 7% ($p=0,067$); Coeficiente de contingencia =0,134. **Estimación de Riesgo** de ser ALV entre haber sido alimentado solo a pecho vs. Fórmula o mixta, OR=1,753 IC_{95%} (0,958; 3,208).

Dentro de las manifestaciones clínicas que se presentaban al inicio de la enfermedad, el sistema respiratorio fue el más afectado en el grupo control 86% (46% rinitis y 35% sibilancias) mientras que solo alcanzó al 17% en el grupo ALV. Estas diferencias se revirtieron para el sistema gastrointestinal donde el 28% de los ALV y solo el 3% de los controles presentaron síntomas como diarrea, vómitos, reflujo gastroesofágico, o cólicos; y no fueron tan marcadas para las manifestaciones dérmicas (dermatitis eczematosa atópica y/o eritema) 14% de los ALV y 10% de los controles.

Tan solo un niño del grupo control presentó combinación de dos o más manifestaciones clínicas, mientras que se dieron en el 42% de los niños del grupo ALV, discriminadas en: Respiratorios + Dérmicos (6%); Gastrointestinales + Dérmicos (4%) Respiratorios + Gastrointestinales (26%) y Respiratorios + Gastrointestinales + Dérmicos (6%), Tabla 4.

Tabla 4. Tipo de manifestaciones clínicas de inicio según grupo de pertenencia

Tipo de alimentación	Grupo		Total
	ALV	Controles	
	n	n	
Respiratorias (R)			
Rinitis	2	42	44
Sibilancias	7	32	39
Rinitis + Sibilancias	6	4	10
Total	15	78	93
% de Tipo Manifestaciones	16,1	83,9	100
% de Diagnóstico	16,5	85,7	51,1
Dérmicas (D)			
Dermatitis Eczematosa	13	9	22
Total	13	9	22
% de Tipo Manifestaciones	59,1	40,9	100
% de Diagnóstico	14,3	9,9	12,1
Gastrointestinales (G)			
Diarrea/Vómitos	20	0	20
Reflujo Gastroesofagico	5	3	8
Total	25	3	28
% de Tipo Manifestaciones	89,3	10,7	100
% de Diagnóstico	27,5	3,3	15,4
Combinación			
R + G	24	1	21
R + D	5	0	5
G + D	4	0	4
G + D + R	5	0	5
Total	38	1	39
% de Tipo Manifestaciones	97,4	2,6	100
% de Diagnóstico	41,8	1,1	21,4
Total	91	91	182

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos; **Prueba chi-cuadrado** para la asociación entre grupo de pertenencia y tipo de manifestaciones clínicas al inicio de la enfermedad significativa al 1% (p=0,000); Coeficiente de contingencia =0,587.

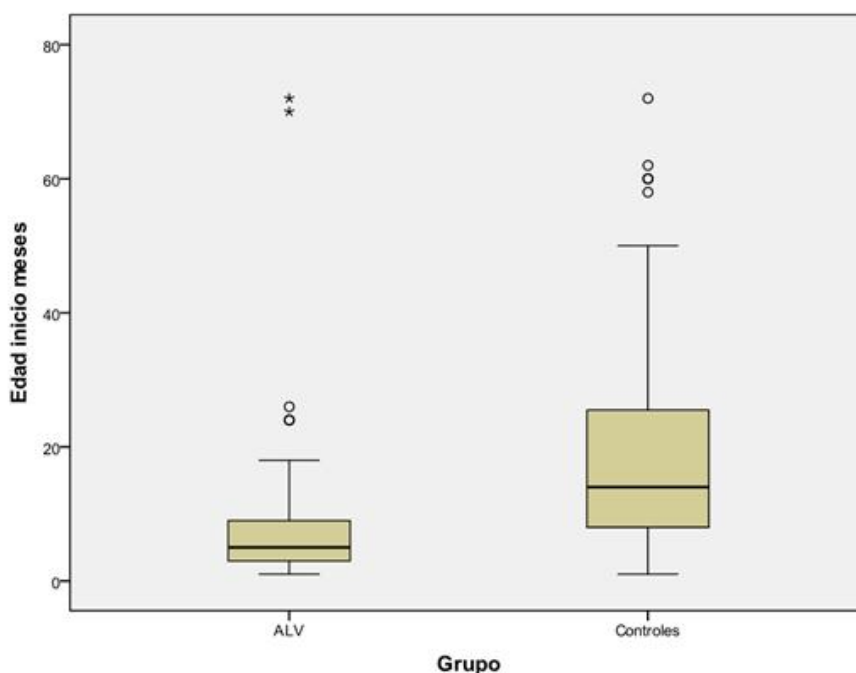


Figura 8. Distribución de la edad al inicio de las primeras manifestaciones clínicas según grupo de pertenencia

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos.
 ★○ Valores Extremos observados, mayores al percentil 95% correspondiente a cada grupo.
 Las barras representan la Media de la edad de inicio del grupo ALV y de los Controles.

Es importante resaltar que si bien solo 8 pacientes de los 182 estudiados tuvieron diagnóstico de reflujo gastroesofágico, en este subgrupo el 63% de ellos pertenecían al grupo ALV.

La prueba de provocación fue positiva en todos los niños ALV y en sólo 7 pacientes fue necesario repetirla con el fin de confirmar el diagnóstico.

La aparición de las primeras manifestaciones clínicas se dio de manera más temprana y con menor variación central, para los lactantes diagnosticados como ALV (promedio 8 meses, mediana 5 meses) que para los del grupo Control (promedio 20 meses, mediana 14 meses), aunque se observaron valores atípicos muy extremos de hasta 72 meses. Las diferencias entre las medias de la edad al inicio de las primeras manifestaciones clínicas para el grupo ALV y para el grupo Control resultaron significativas al 1% ($p < 0,001$), tanto en la aplicación de contrastes paramétricos como no-paramétricos, Figura 8, Tabla 5 y Tabla 5a.

Tabla 5. Valores característicos de la Edad (en meses) en que inician las primeras manifestaciones clínicas en cada grupo

	ALV		Controles	
Estadísticos de la Edad de las primeras manifestaciones	Media	7,98	Media	20,41
	Mediana	5,00	Mediana	14,00
	Desv. típ.	11,08	Desv. típ.	17,09
	Mínimo/Máximo	0-72	Mínimo/Máximo	1-72
	Percentil 90	15,8	Percentil 90	48,0
	Percentil 95	24,0	Percentil 95	60,0
	Amplitud intercuartil	6,00	Amplitud intercuartil	18,00

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos

Tabla 5a. Pruebas de significación para diferencias de medias de la edad de inicio de las primeras manifestaciones clínicas entre ambos grupos

Test utilizado	Estadístico de contraste	Valor p*
Test t de student	-5,819	0,000
Z de Kolmogorov-Smirnov	3,261	0,000
U de Mann-Whitney	1803,000	0,000
W de Wilcoxon	5989,000	0,000

(*) Todos los contraste resultaron significativos al 1% ($p < 0,001$)

Por otra parte, al categorizar la variable según si las primeras manifestaciones clínicas se daban dentro del primer año de vida (< 12 meses) o después (> de 12 meses) se obtuvo una asociación significativa al 1% ($p < 0,001$) con un OR = 9,04, Tabla 6.

Tabla 6. Inicio de las primeras manifestaciones clínicas antes y después del año de edad en el grupo ALV vs. Controles

Inicio Primeras Manifestaciones	Grupo		Total
	ALV n	Controles n	
Antes del año	81	43	124
Después del año	10	48	58
Total	91	91	182

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos; **Prueba chi-cuadrado** para la asociación entre grupo de pertenencia e inicio de las primeras manifestaciones clínicas antes del año, significativa al 1% ($p=0,001$); Coeficiente de contingencia =0,409. **Estimación de Riesgo** de ser ALV entre tener las primeras manifestaciones clínicas antes del año y después del año, OR=9,042 IC_{95%} (4,165; 19,630).

Igual nivel de significación ($p<0,001$) presenta la asociación si la categorización se realiza desde los 3 meses de vida en adelante o hasta los 3 primeros meses, pero con un menor OR = 5,10, Tabla 7.

Tabla 7. Inicio de las primeras manifestaciones clínicas antes y después de los 3 meses de edad en el grupo ALV vs. Controles

Inicio Primeras Manifestaciones	Grupo		Total
	ALV n	Controles n	
0 a 3 meses	30	8	38
> 3 meses	61	83	144
Total	91	91	182

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos; **Prueba chi-cuadrado** para la asociación entre grupo de pertenencia e inicio de las primeras manifestaciones antes de 3 meses de edad: significativa al 1% ($p=0,000$); Coeficiente de contingencia =0,285. **Estimación de Riesgo** de ser ALV entre tener las primeras manifestaciones antes de los 3 meses y después de los 3 meses, OR=5,102 IC_{95%} (2,187; 11,903).

Cuando se discriminó de acuerdo al tipo de alimentación recibida por cada grupo, se encontró que dentro de los lactantes ALV el inicio de la enfermedad se dio, en promedio, primero en el grupo F (5 meses), luego en el M (8 meses) y por último en el P (9,5 meses); mientras que para los controles los P presentaron sus primeros síntomas a los 18 meses y casi no hubo diferencias entre los F (21 meses) y los M(23 meses); sin embargo, la aplicación del ANOVA no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre las medias de la edad de inicio de la enfermedad según el tipo de alimentación recibida tanto en el grupo ALV ($p=0.537$) como en los controles ($p=0.461$). Figura 9, Tabla 8, Figura 9a y Figura 9b.

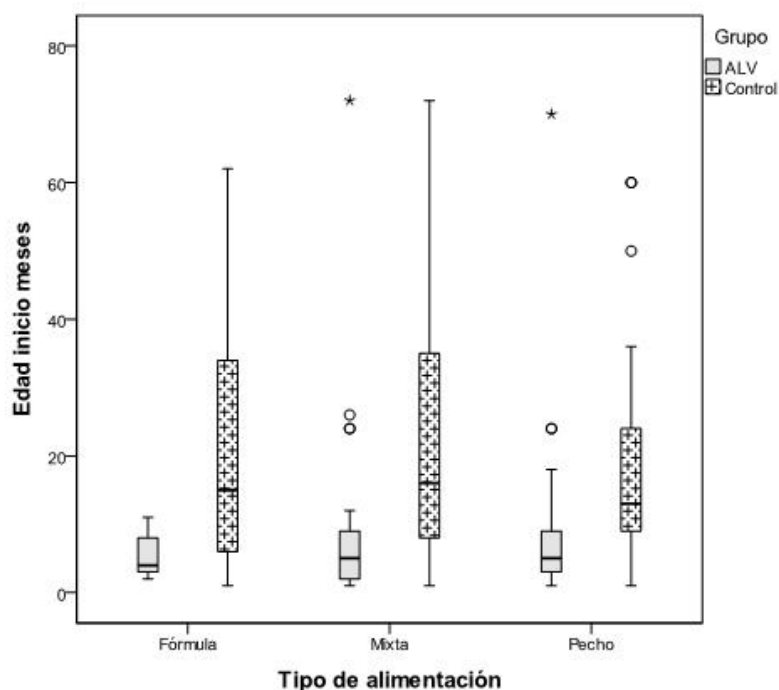


Figura 9. Edad de inicio de las primeras manifestaciones clínicas según el tipo de alimentación recibida por los niños del grupo ALV vs. Controles

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos.
 ★ ○ Valores Extremos observados, mayores al percentil 95% correspondiente a cada grupo.
 Las barras representan la Media de la edad de inicio del grupo ALV y de los Controles.

Tabla 8. Valores característicos de la edad de inicio de las primeras manifestaciones clínicas según el tipo de alimentación recibida por los niños del grupo ALV y Controles

Grupo	Tipo de alimentación	Media	Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Amplitud intercuartil
ALV	Fórmula	5,38 ± 0,9	4,00	3,254	2	11	6
	Mixta	7,78 ± 1,6	5,00	11,027	0	72	7
	Pecho	9,48 ± 2,5	5,00	13,271	1	70	7
Controles	Fórmula	21,21 ± 4,8	15,00	18,04	1	62	29
	Mixta	22,83 ± 3,2	16,00	19,42	1	72	28
	Pecho	18,00 ± 2,3	13,00	14,51	1	60	15

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos; **Prueba ANOVA** para la comparación de medias de la edad de las primeras manifestaciones clínicas según el tipo de alimentación no significativa, ni en el grupo ALV, ($p=0,537$) ni en el grupo de Controles ($p=0,461$).

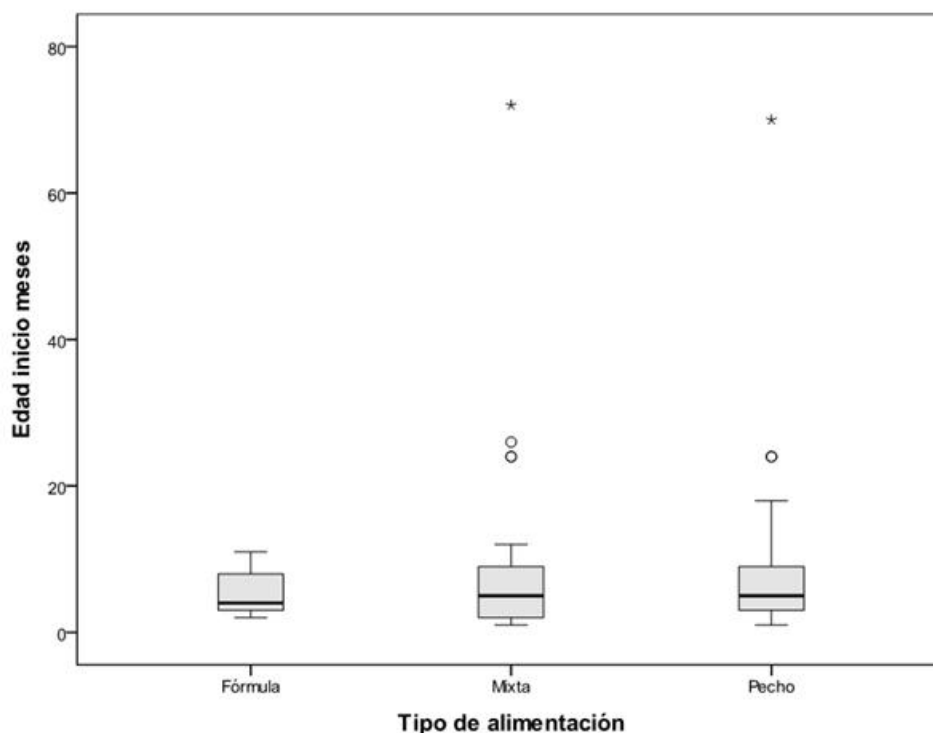


Figura 9a. Edad de inicio de las primeras manifestaciones clínicas según el tipo de alimentación recibida por los niños del grupo ALV

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos.
 ★ O Valores Extremos observados, mayores al percentil 95% correspondiente a cada grupo.
 Las barras representan la Media de la edad de inicio del grupo ALV y de los Controles.

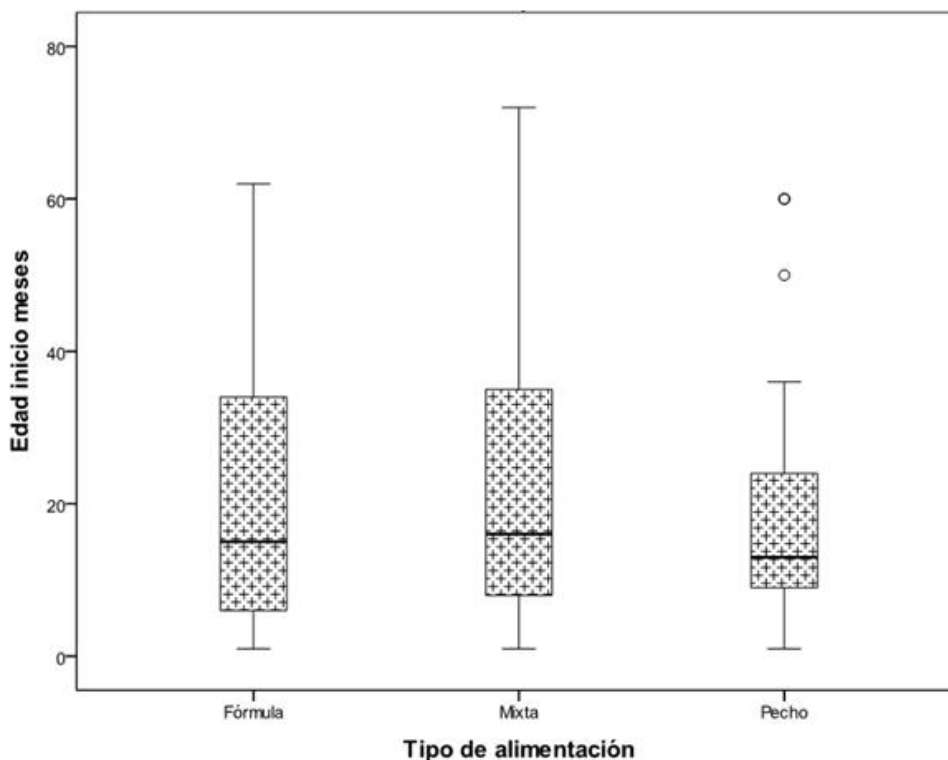


Figura 9b. Edad de inicio de las primeras manifestaciones clínicas según el tipo de alimentación recibida por los Controles.

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos.
 ★ O Valores Extremos observados, mayores al percentil 95% correspondiente a cada grupo.
 Las barras representan la Media de la edad de inicio del grupo ALV y de los Controles.

La asociación entre antecedentes familiares de alergia y diagnóstico de ALV fue significativa al 5% ($p=0,04$). El 80% de los niños ALV registraban antecedentes familiares de alergia, con mayor proporción para antecedentes maternos 32%, 25% de ambos progenitores y 23% del padre; mientras que solo el 63% de los controles los presentaban, correspondiendo a antecedentes del padre el 24%, 22% de la madre y el 17% a ambos, Tabla 9.

Tabla 9. Presencia de antecedentes familiares de alergia en los niños del grupo ALV y en los Controles

Antecedentes Familiares de Alergia	Grupo		Total
	ALV n	Controles n	
Ambos	23	15	38
Madre	29	20	49
Ninguno	18	34	52
Padre	21	22	43
Total	91	91	182

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos; **Prueba chi-cuadrado** para la asociación entre grupo de pertenencia y antecedentes hereditarios, significativa al 5% ($p=0,041$); Coeficiente de contingencia =0,209.

Cuando se reagrupó a los pacientes según la presencia de antecedentes maternos de alergia, la asociación resultó significativa al 1% ($p=0,012$), evidenciada en que más de la mitad (57%) de las madres de los niños diagnosticados con ALV eran alérgicas; estimándose además que, un paciente con antecedentes maternos, tiene el doble de chances ($OR=2,13$) de ser ALV con respecto al que no los tiene, Tabla 10.

Tabla 10. Presencia de antecedentes maternos de alergia en los niños del grupo ALV vs. Controles

Antecedentes Maternos de Alergia	Grupo		Total
	ALV n	Controles n	
SI	52	35	87
No	39	56	95
Total	91	91	182

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos; **Prueba chi-cuadrado** para la asociación entre grupo de pertenencia y antecedentes hereditarios maternos, significativa al 1% ($p=0,012$); Coeficiente de contingencia =0,184. **Estimación de Riesgo** de ser ALV entre tener antecedentes maternos y no tenerlos, $OR=2,133$ $IC_{95\%}$ (1,180; 3,857).

Aunque sólo 58 (32%) de los pacientes vivían en ambientes de fumadores, más de la mitad de los mismos (60%) pertenecían al grupo ALV; además, se pudo

observar que el 39% de los ALV estaban expuestos a humo de cigarrillo mientras que para los controles esa proporción desciende al 25%. Se encontró una asociación significativa al 5% ($p=0,05$) y la estimación del riesgo indicó que un niño expuesto a humo de cigarrillo tiene 85% más chances de ser ALV que aquel no expuesto ($OR=1,85$), Tabla 11.

Tabla 11. Exposición a humo de cigarrillo en los niños del grupo ALV vs. Controles

Ambiente fumadores	Grupo		Total
	ALV n	Controles n	
Si	35	23	58
No	56	68	124
Total	91	91	182

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos; **Prueba chi-cuadrado** para la asociación entre grupo de pertenencia y exposición a humo de cigarrillo, significativa al 10% ($p=0,056$); Coeficiente de contingencia =0,140. **Estimación de Riesgo** de ser ALV entre estar expuesto al humo de cigarrillo y no estarlo. $OR=1,848$ $IC_{95\%}$ (0,980; 3,483).

Del análisis de correspondencia múltiple, se desprende claramente que los pacientes diagnosticados como ALV se agrupan en torno a varones con una alimentación de tipo mixta, que presentan antecedentes familiares de alergia (madre, padre o ambos) y manifestaciones clínicas combinadas o de tipo dérmicas o gastrointestinales, viven en ambientes expuestos a humo de cigarrillo y la edad de los primeros síntomas es anterior a los 12 meses de edad.

Los controles por su parte, conforman un grupo constituido por niñas alimentadas exclusivamente con pecho, que no tienen antecedentes familiares alérgicos, viven en ambientes libres de humo de cigarrillo, los primeros síntomas se presentan después del año de vida y las manifestaciones clínicas son respiratorias, Figura 10.

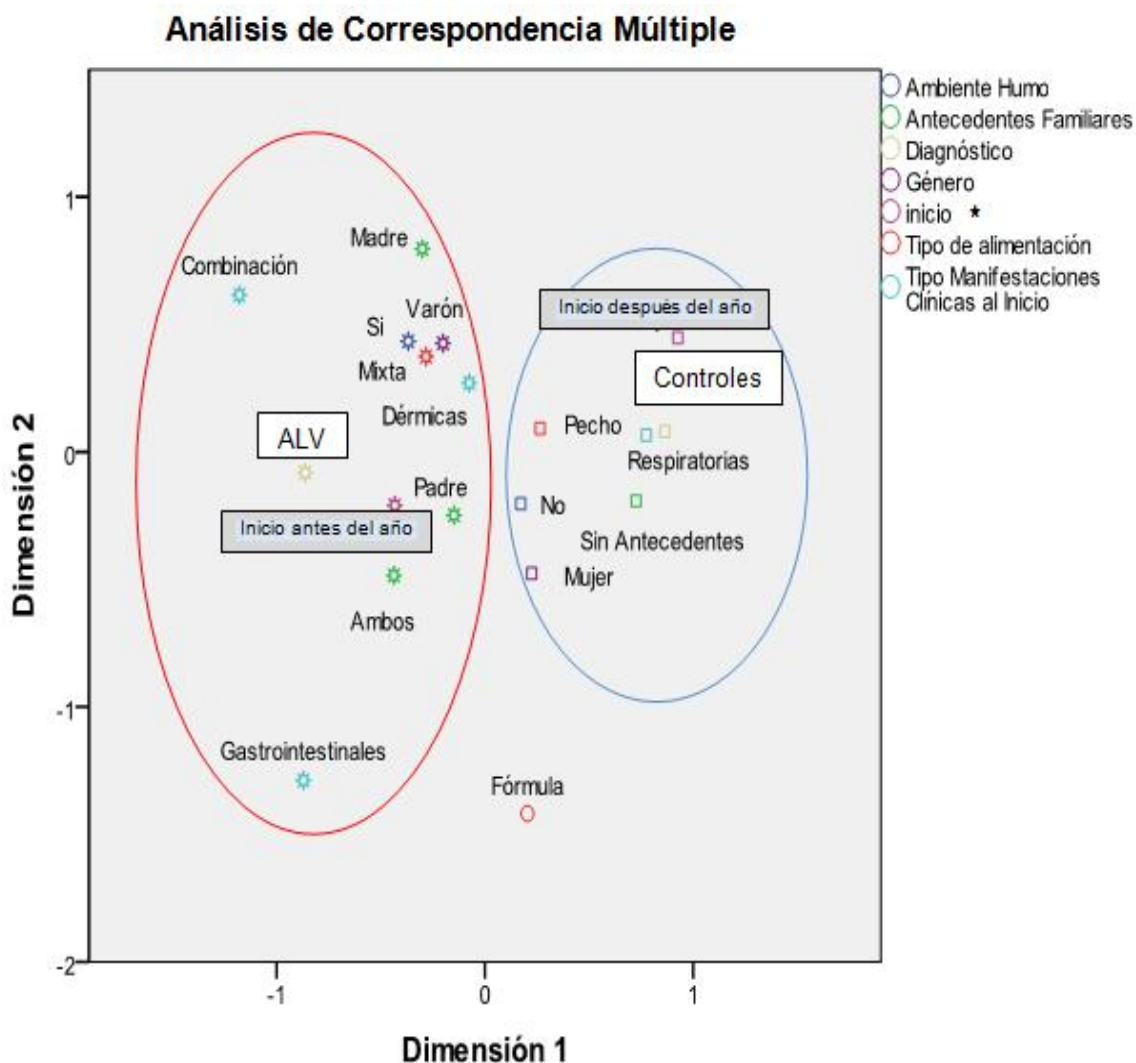


Figura 10. Factores asociados para el riesgo de ALV (Diagrama conjunto de puntos de categorías)

ALV= grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; Controles= grupo de niños sanos. Inicio antes y después del año de las primeras manifestaciones clínicas.

También se consideraron los distintos factores de exposición que, individualmente, pueden influir sobre el desarrollo la enfermedad de manera significativa a fin de generar un índice predictivo para el riesgo de ALV. Para ello, se asignó un puntaje en función de los valores de los OR individuales y se estableció el criterio de clasificar como ALV los casos con 15 puntos o más, sobre un total de 121 puntos, Tabla 12.

Tabla 12. Asignación de puntajes basados en los OR individuales de factores significativos para la construcción de un índice predictivo del riesgo de ALV

Factores de Exposición		Grupo		Total
		ALV	Controles	
Tipo Alimentación OR = 1,75 (*) Ptos = 2	Fórmula o mixta	62	50	112
	Sólo Pecho	29	41	70
Edad de Inicio 1º Síntomas OR = 9,04 (***) Ptos =9	Antes del año	81	43	124
	Después del año	10	48	58
Exposición al Humo de Cigarrillo OR = 1,85 (**) Ptos = 2	Sí	35	23	58
	No	56	68	124
Antecedentes Maternos OR = 2,13 (***) Ptos = 2	Sí	52	35	87
	No	39	56	95
TMC Gastrointestinales OR = 38,23 (***) Ptos = 38	Sí	58	4	62
	No	33	87	120
TMC Dérmicas OR = 3,84 (***) Ptos = 4	Sí	27	9	36
	No	64	82	146
TMC Combinaciones OR = 64,53 (***) Ptos = 64	Sí	38	1	39
	No	53	90	143

ALV= grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**= grupo de niños sanos.
TMC= tipo de manifestaciones clínicas al inicio; **OR**=Odds Ratio; **Ptos**=puntaje de impacto asignado al factor.
 (*) Significativo al 10% ($p < 0,10$); (**) Significativo al 5% ($p < 0,05$); (***) Significativo al 1% ($p < 0,01$)

En la Tabla 13 se muestra la evaluación diagnóstica del índice predictivo basado en el puntaje obtenido.

Tabla 13. Evaluación diagnóstica del índice predictivo basado en el puntaje de OR Individuales

Estado Real Vs. Grupo Estimado	OR * (95% IC)	Global ROC* % (95% IC)	Sensibilidad %	Especificidad %	Predictivo (+) %	Predictivo (-) %
OR individuales	49 (20;120)	86,8 (81,1;92,5)	82,4	91,2	41,2	45,6

(*) $p < 0,001$

A través del modelo de Regresión Logística Binaria se obtuvieron los factores significativos que de manera conjunta pueden incidir en la probabilidad de padecer ALV, a saber: la edad de inicio de la sintomatología ($p=0,007$), el tipo de alimentación ($p=0,003$), el tipo de ambiente ($p=0,031$), los antecedentes maternos ($p=0,028$) y la presencia de manifestaciones gastrointestinales ($p<0,001$), dérmicas ($p<0,001$) y combinaciones ($p=0,025$).

De manera más específica, los datos revelan que: a) la alimentación en base a Fórmula o Mixta eleva en casi 4 veces las chances de ser ALV ($OR=3,75$) con respecto a si es alimentado sólo a Pecho; b) el retardo en un mes en la aparición de los primeros síntomas las disminuye ($OR=0,96$); c) los niños/as con antecedentes maternos ($OR=2,58$) y los que viven en ambientes con humo de cigarrillo ($OR=2,75$) tienen más del doble de chances de ser ALV; d) las chances de ser ALV son 15 veces más si tiene manifestaciones gastrointestinales ($OR=14,71$) y alrededor de 11 veces más, si son de tipo dérmicas ($OR=11,46$) o combinaciones ($OR=10,64$), Tabla 14.

Tabla 14. Factores de exposición para el Riesgo de ALV (Modelo de Regresión Logística)

	β	p-valor	EXP(β)	I.C. 95% para EXP(β)	
				Inferior	Superior
EDADIN_M (edad de inicio de las manifestaciones clínicas)	-,042	,007	,959	,930	,989
ANTMADRE (antecedentes maternos de alergia)	,949	,028	2,582	1,106	6,030
HUMO (exposición al humo de cigarrillo)	1,013	,031	2,754	1,099	6,904
DERMICAS (manifestaciones clínicas dérmicas)	2,439	,000	11,458	3,538	37,113
GASTROIN (manifestaciones clínicas gastrointestinales)	2,684	,000	14,706	5,291	40,000
PECHO (alimentación exclusiva con pecho materno)	1,322	,003	3,750	1,582	8,886
COMBIN (combinación de dos o más tipos de manifestaciones clínicas)	2,365	,025	10,643	1,352	83,800

Evaluación del modelo: $\chi^2 = 122,59$ con 7 g.l.; p-valor=0,000; -2LV=129,72; R^2 de Cox y Snell=0,490; R^2 de Nagelkerke=0,653.

Lo anterior permite determinar distintos perfiles clínicos como por ejemplo, si el lactante no tiene antecedentes maternos de alergia, vive en una ambiente libre de humo de cigarrillo, se alimentó exclusivamente con pecho materno, solo presenta manifestaciones clínicas respiratorias y los primeros síntomas se dieron después de los dos años, la probabilidad de ser ALV se estima en 0.023 (2%); por el contrario, si tiene antecedentes maternos de alergia, su alimentación fue con Fórmula o Mixta, vive en un ambiente expuesto al humo de cigarrillo, presentó los primeros síntomas en el 2º mes de vida y además tuvo manifestaciones dérmicas, gastrointestinales y combinaciones al inicio de la enfermedad, la probabilidad estimada de ser ALV es de 0.993 (99%), Tabla 15.

Tabla 15. Perfiles clínicos según la probabilidad estimada de ALV por la Regresión Logística

Antecedentes	Alimentación	Edad IMC	Ambiente Humo	Manifestaciones clínicas dérmicas	Manifestaciones clínicas gastrointestinales	Manifestaciones clínicas combinadas	P(ALV)
No	Pecho	26	No	No	No	No	0,023
Madre/Ambos	Fórmula/Mixta	2	Si	Si	Si	Si	0,993
Madre/Ambos	Pecho	3	Si	Si	No	No	0,831
No	Pecho	18	Si	No	Si	No	0,564
Madre/Ambos	Fórmula/Mixta	10	No	No	No	No	0,303

En función de estos resultados se generó un índice predictivo basado en la Regresión Logística; el grupo pronosticado clasifica como ALV si la probabilidad estimada a partir del modelo considerado es superior a 0.50 (punto de corte 0.5).

La evaluación diagnóstica del mismo se resume en la Tabla 16.

Tabla 16. Evaluación diagnóstica del Índice Predictivo basado en la Regresión Logística

Estado Real Vs. Grupo Estimado	OR * (95% CI)	Global ROC* % (95% CI)	Sensibilidad %	Especificidad %	Predictivo (+) %	Predictivo (-) %
Regresión Logística	40 (17 ; 94)	85,7 (79,8;91,6)	81,3	90,1	40,7	45,1

(*) p<0,001

Adicionalmente, se agruparon estos factores fácilmente obtenibles en la práctica clínica diaria en cualquier nivel de atención, en criterios mayores y menores, con el fin de desarrollar índices clínicos predictivos que facilite al médico tratante, la identificación de pacientes con riesgo de desarrollar la enfermedad, Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de factores de riesgo de desarrollar ALV según criterios Mayores y Menores

Mayores	Menores
Edad de Inicio antes de año Alimentación con fórmula o mixta	MCI Dérmicas MCI Gastrointestinales MCI Combinación de MC Antecedentes Madre Ambiente con humo de cigarrillo

Concretamente, a través de distintas combinaciones de estos criterios se obtuvieron tres índices predictivos que identifican como posible ALV a pacientes que presenten: a) 1 criterio Mayor y 2 menores; b) 2 criterios Mayores y 1 menor; y c) 2 criterios mayores y al menos 1 menor o 1 mayor y al menos 2 menores.

El resumen de la eficacia predictiva de cada uno de los índices basados en estas combinaciones de criterios, se presenta en la Tabla 17.

Tabla 17. Evaluación diagnóstica del Índice Predictivo basado en la combinación de criterios

Estado Real Vs. Grupo Estimado	OR * (95% CI)	Global ROC* % (95% CI)	Sensibilidad %	Especificidad %	Predictivo (+) %	Predictivo (-) %
1 Mayor y 2 menores	16 (8 ; 35)	79,1 (72,3;86,0)	71,4	86,8	35,7	43,4
2 Mayores y 1 menor	13 (6 ; 28)	75,3 (68,0;82,5)	61,5	89,0	30,8	44,5
2 Mayores y 1 menor o 1 Mayor y 2 menores	22 (10 ; 48)	81,9 (75,4;88,3)	86,8	76,9	43,4	38,5

(*) p<0,001

La investigación genética se realizó en la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, con la aprobación del Comité de Bioética del Ministerio de Salud, Gobierno de la Provincia de Córdoba. Resolución Nº 296 (adjunta en Anexos).

La Región D-Loop (HVI, II y III) del Genoma mitocondrial (Gmt), fue comparada con cada matriz de la Región HVI, II y III de cada paciente, observándose que las variantes de la Región HVI, se distribuyen acercándose o alejándose del Gmt.

El árbol usado para guía del proceso de múltiple alineamiento final, mostró que el paciente 13a BS, es el más próximo al Gmt, el 2a CG el más alejado, y el 1a MJC está ancestrado con el Gmt y con 13a BS, pero se aleja ancestralmente de los otros, mientras que el árbol dibujado para la HVII y HVIII, no refleja lo mismo, aunque si lo hace para 2b CG y 17b LB.

Esto demuestra los cambios sufridos en el tiempo para ciertas variables (cambios nucleotídicos).

En la Tabla 18, se muestran los haplogrupos y la identificación de cada variante o mutación de la población estudiada, tanto de la Región HVI como HVII y HVIII, siguiendo los datos registrados en el mapa genético (www.mitomap.org; www.genpat.uu.se/mtDB).

Tabla 18. Haplogrupos y variantes en los niños estudiados (n=41)	
HAPLOGRUPOS	N
WT, A+C B (Europa, Asia)	2
RXIZGDZV, A+C+B (Europa, Asia)	10
ACBV (Asia, Europa)	1
WDEG, ACB (Europa, Asia)	5
RXIZGD, UK,Hvgroup; Q, A+C1+B (Europa, Asia))	5
B++ AC1 (Asia)	1
UK, Hvgroup, Q, Z, V, A+C1B (Europa, Asia)	6
T, J, Tjgroup, WT, A+ C+ (Europa, Asia)	6
Q (Asia)	1
T, J, Tjgroup, UK, Hvgroup, Q, DE, A++C+B (Europa, Asia)	1
ACB (Asia)	3
Total	41

Tanto los niños con ALV como en los controles, presentaron prevalencia de los siguientes haplogrupos: RXIZGDZV; A+C+B; TJgroup; UK,HVgroup; q; z; v; A+C1B y ACB, (el signo + indica frecuencia). Además, en la Tabla 19, se muestra su distribución porcentual por áreas geográficas en los pacientes y en los controles.

Tabla 19. Distribución de haplogrupos por regiones geográficas en el grupo de niños alérgicos a la leche de vaca (ALV) y en los sanos (Controles)					
HAPLOGRUPO	Controles N	ALV n	Controles %	ALV %	Total %
Europeo	21	9	51,22	21,95	73,17
Asia – Europeo	5	0	12,20	0,00	12,20
Asia - Americano	3	2	7,32	4,88	12,20
Africano	1	0	2,44	0	2,44
Sub-Total	30	11	73,17	26,83	100,00

También se identificó cada variante, su frecuencia, su pertenencia a un haplogrupo o no, si es una variable identificada en el (www.mitomap.org; www.genpat.uu.se/mtDB/) y con qué otras variantes se encuentra asociada, además de la región ancestral de donde provienen.

Como resultado de este procedimiento se observó la prevalencia del haplogrupo C; Tjgroup; y la variante no descrita T16519C, Figura 11.

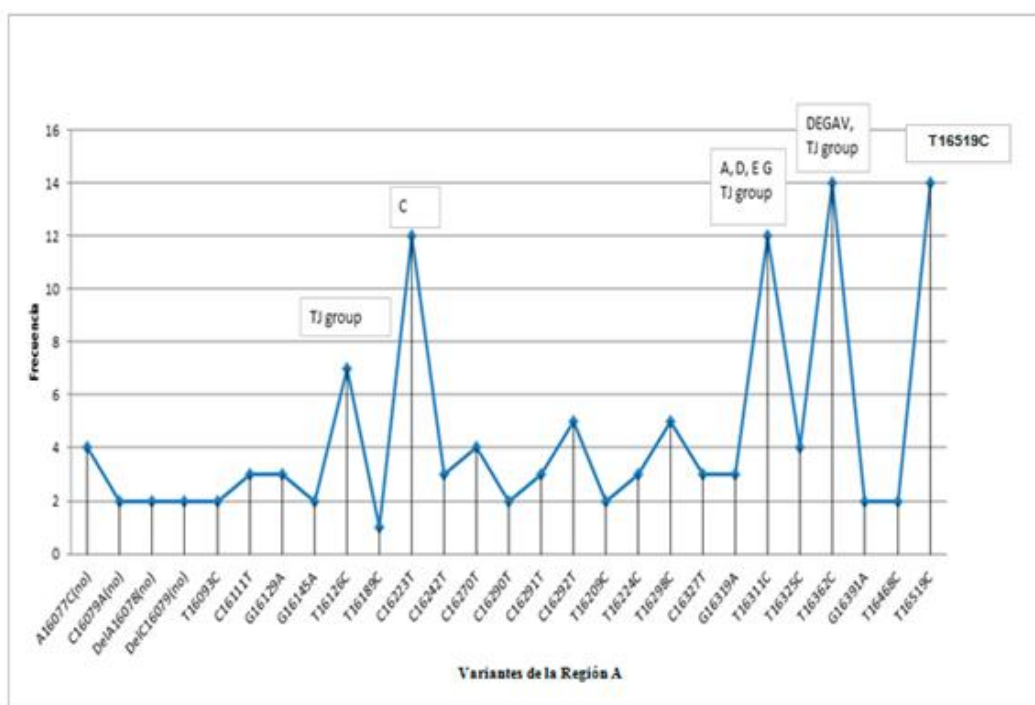


Figura 11. Prevalencia de haplogrupos y de la mutación o variante no descrita (T16519) en la población estudiada (n=41)

No se encontró asociación entre los haplogrupos y la enfermedad. Sin embargo, el diagnóstico de ALV y la presencia de la variante mencionada se asociaron significativamente al 10% ($p=0.095$) Tabla 20.

Tabla 20. Presencia de la mutación Genética (T16519C) en el grupo ALV vs. grupo Control

Mutación Genética		Grupo		Total
		Controles	ALV	
NO	Recuento	22	5	27
	% dentro de Mutación Genética	81,5	18,5	100,0
	% dentro de Grupo	73,3	45,5	65,9
	% del total	53,7	12,2	65,9
SI	Recuento	8	6	14
	% dentro de Mutación Genética	57,1	42,9	100,0
	% dentro de Grupo	26,7	54,5	34,1
	% del total	19,5	14,6	34,1
Total	Recuento	30	11	41
	% dentro de Mutación Genética	73,2	26,8	100,0
	% dentro de Grupo	100,0	100,0	100,0
	% del total	73,2	26,8	100,0

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca; **Controles**=grupo de niños sanos; **Prueba chi-cuadrado** para la asociación entre grupo de pertenencia y presencia de la mutación genética, significativa al 10% ($p=0,095$); Coeficiente de contingencia =0,252. **Estimación de Riesgo** de ser ALV entre tener la mutación genética y no, OR=3,300 IC_{95%} (0,785; 13,879).

Un paciente que posea la variante T16519C, tiene 3 veces más probabilidad de ser ALV que aquel que no la presenta (OR=3.3). La evaluación del indicador puede resumirse como: Área ROC global 64%; Sensibilidad 55%; Especificidad 73%; Predictivo Positivo 43%; Predictivo Negativo 82%. Además, encontramos la mutación T16519C no descrita en la transición de haplogrupos asociada significativamente con los pacientes ALV con manifestaciones clínicas de Dermatitis Atópica (DA) + Enfermedad Gastrointestinal (EGI) en 6 de 6 casos, mientras que no estuvo presente en ninguno de los 5 pacientes ALV que tenían manifestaciones clínicas de Rinitis y Asma. En el grupo control tampoco hubo una asociación

significativa, solo 8 pacientes de los 30 presentaron la mutación, $p=0,0312$ RR 2,900, Figura 12.

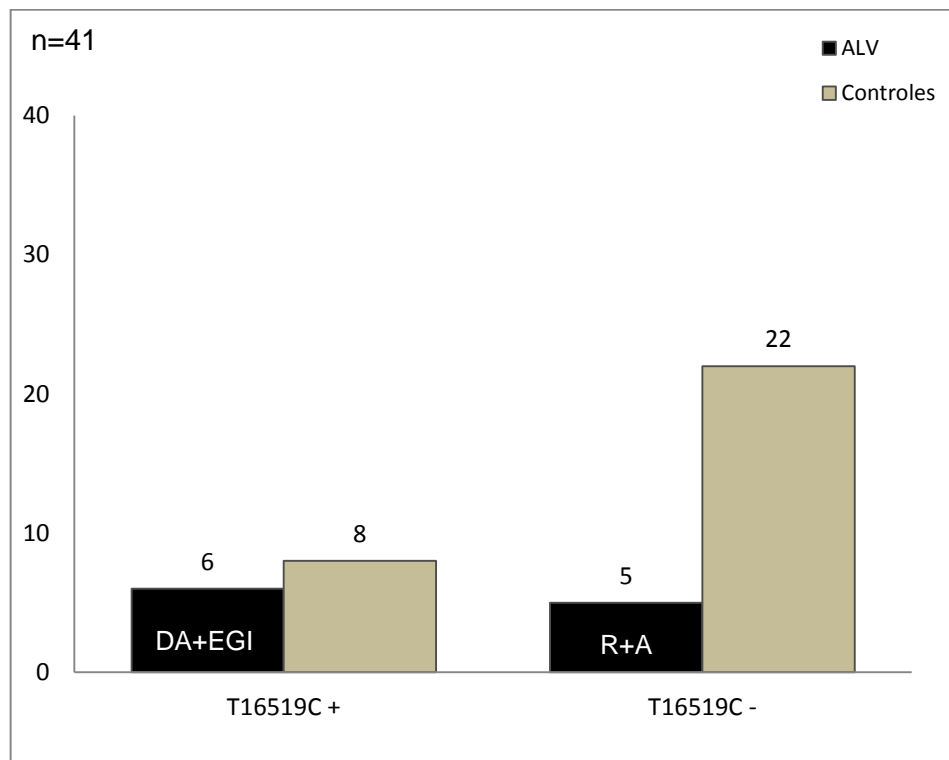


Figura 12. Relación entre manifestaciones clínicas y la variante no descrita T16519C en niños ALV vs. Controles.

ALV= grupo de niños alérgicos a la leche de vaca; Controles: pacientes sanos.

D/GI= Dermatitis Atópica/Enfermedad gastrointestinal.

R/As= Rinitis/Asma.

Consideraciones ampliadas sobre los resultados

Si bien, es conocido que las secuencias evolucionan mediante mutaciones, ya sean inserciones, deleciones, etc., nosotros nos limitamos a estudiar las mutaciones.

Aplicamos para ello, los dos modelos más sencillos, Jukes-Cantor y Kimura con dos parámetros^{99, 100}.

Los modelos sencillos asumen que en una secuencia cada “sitio” evoluciona de forma independiente. Sólo necesitamos el modelo de evolución de cada sitio.

Como en cada sitio puede haber 4 estados A,G,C,T; necesitamos conocer las probabilidades de cada una de las mutaciones en un tiempo t .

Una vez escogido el modelo, la distancia entre dos secuencias se puede pensar como la suma del tiempo de evolución transcurrido desde la “bifurcación” de su ancestro común más cercano, en la búsqueda del nucleótido ancestro equiprobable, en la que también influye el peso.

Al identificar los haplogrupos con población sana (controles) y enferma (ALV), observamos la prevalencia del haplogrupo C en la constitución de los diferentes haplotipos, este haplogrupo deriva del haplogrupo M y este del haplogrupo L (Africano), migrado a Asia y América, como así también, la prevalencia de los haplogrupos TJgroup (europeo); y Z (deriva del haplogrupo C); A+C+B deriva de Asia.

Capítulo IV

DISCUSIÓN

La edad de inicio de la enfermedad, en nuestro estudio, fue marcadamente menor en los lactantes del grupo ALV que en los niños del grupo Control, esto independientemente del tipo de alimentación recibida durante el primer trimestre de vida.

Nuestros resultados coinciden con lo comunicado por otros autores en que la exposición oral a proteínas foráneas en las primeras etapas de la vida tiende a inducir sensibilización más que tolerancia y podría determinar hipersensibilidad en individuos predispuestos ¹⁰¹.

En el suero de lactantes con alimentación materna exclusiva se ha detectado la presencia de alérgenos relacionados con las distintas proteínas de la leche de vaca, huevo, trigo, maní y otros ^{102, 103}.

Así, los alérgenos ingeridos por la madre y transferidos en mínimas dosis, vía leche materna, pueden favorecer la respuesta Th2 y activar la producción exagerada de IgE en niños predispuestos ¹⁰⁴.

Sin embargo, existen otras investigaciones que señalan a la exclusión de la dieta materna de alimentos probablemente alergénicos (durante el embarazo o la lactancia) como no beneficiosa ⁴².

Para determinar la influencia de la leche de vaca, huevo y trigo, sobre el comportamiento inmunológico del lactante, hemos estudiado la presencia en el suero de antígenos completos e incompletos, relacionados con dichos alimentos y la curva de desarrollo de los niveles de IgE sérica total, además de la aparición o incremento de IgE o IgG específicas (tanto en sangre de cordón umbilical como en sangre venosa) a los 120 días de edad.

Nosotros concluimos que era indudable la influencia ejercida por la alimentación recibida, durante las primeras semanas de vida, sobre los niveles séricos de IgE total e IgE e IgG específicas, aunque no observamos relación con la presencia en el suero de los alérgenos alimentarios estudiados.

En esta investigación no se pudo encontrar un modelo único de respuesta humoral ¹⁰⁵.

El presente estudio revela que la alimentación con leche materna exclusiva (P) proporcionada por madres sin dietas restrictivas, comparada con la alimentación con fórmulas a base de leche de vaca (reunidos F y M), mostró tener cierto efecto protector contra la aparición temprana de la hipersensibilidad a la leche de vaca.

Este efecto protector es conocido de ser moderado, limitado y quizás restringido a lactantes con alto riesgo de atopía y no hay datos que demuestren si varía de acuerdo a la herencia genética ^{106, 107}.

Hace varios años estudiamos, el probable efecto protector que ejerce la lactancia materna contra la enfermedad alérgica y coincidimos con otros autores en que la alimentación con el pecho materno, durante los primeros 4 meses de vida, protege al niño de alto riesgo, cuando la madre observa un estricto control ambiental y una dieta de exclusión de los alimentos más alergénicos ¹⁰⁸.

Estudios prospectivos recientes coinciden en señalar que la lactancia materna exclusiva, durante no menos de 4 meses y combinada con la introducción de alimentos sólidos, después del cuarto mes de edad, se asocia con riesgo reducido de alergia alimentaria, particularmente, en lactantes de alto riesgo ²². En otra investigación, la alimentación exclusivamente con pecho durante 4 meses o más, reduce el riesgo de padecer asma durante los primeros 4 años de edad, independientemente del grado de sensibilización a aero-alergenos que esos niños posean ¹⁰⁹.

Por otra parte, cuando no es posible mantener la alimentación materna por 4-6 meses o esta es insuficiente, se ha demostrado, una significativa reducción de alergia alimentaria en lactantes de alto riesgo, si ellos son alimentados con fórmulas basadas en hidrolizados proteicos ¹¹⁰.

Al respecto, un meta-análisis de 15 estudios, ha confirmado que el efecto preventivo de las fórmulas parcialmente hidrolizadas, es similar al que posee la leche materna en aquellos lactantes con riesgo de padecer enfermedad atópica ¹¹¹.

Es importante mencionar, que existen estudios retrospectivos que destacan el valor de los nutrientes elaborados a base de soja en la prevención de atopía.

Más aún, un estudio prospectivo y randomizado, concluyó que la alimentación con soja en las primeras semanas de vida, reduce la incidencia de asma y de rinitis ¹¹². Sin embargo, la falta de efectividad en mejorar la dermatitis atópica, llevó a investigaciones sobre su estructura antigénica, de las que surge que esta legumbre, no debe ser considerada hipoalérgica ni beneficiosa en la prevención de la enfermedad alérgica ¹¹³.

Entre las manifestaciones clínicas que tuvieron lugar al inicio de la enfermedad prevalecieron las combinaciones (gastrointestinales y/o dérmicas y/o respiratorias) seguidas por las gastrointestinales y luego las dérmicas.

Coincidiendo con estos resultados, en la mayoría de las investigaciones en poblaciones de niños ALV, existe una superposición en la presentación de síntomas que son a menudo confirmados con el desafío oral ⁴².

La rinitis y/o sibilancias también estuvieron presentes al inicio de la enfermedad en los lactantes ALV. Actualmente, esta presentación clínica es considerada como predictiva de la persistencia de ALV ¹¹⁴.

Por otro lado, la ALV ha sido asociada con la Enfermedad por Reflujo Gastro-Esofágico (ERGE) y en ocasiones hasta responsabilizada de inducirla. Estos datos obligan a los pediatras a investigar esta posible concomitancia en todos los niños menores de 1 año que tienen ERGE ¹¹⁵. Al respecto, hayamos un número bajo de lactantes con diagnóstico de reflujo gastro-esofágico, aunque la mayoría de ellos pertenecían al grupo ALV. Actualmente un estudio realizado en niños con ALV y sospecha de ERGE, demostró que la exposición a las proteínas lácteas aumenta poco el número de episodios de reflujo ácido ¹¹⁶.

Por razones prácticas y por la edad de los niños, el desafío oral abierto resultó el método adecuado para alcanzar el diagnóstico en la población estudiada, ya que las pruebas diagnósticas para clasificar a la ALV en mediada o no por IgE poseen baja sensibilidad en lactantes menores de 12 meses de edad ^{117, 118, 119}.

En nuestro trabajo, la historia familiar de atopía y en especial la materna es un potente factor de riesgo asociado con el diagnóstico de ALV.

Estudios provenientes de gemelos confirman la importancia de la variación genética y más aún cuando esta se asocia con otras enfermedades atópicas ^{120, 121}. Sin embargo, los genotipos asociados con la ALV son desconocidos y podrían ser responsables de la marcada variabilidad de la respuesta clínica individual a las proteínas lácteas ¹²².

En este sentido, la predisposición genética conduce a la producción de citocinas predominantemente Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 y IL-13) que contribuyen a la sensibilización alérgica, originada en defectos intrínsecos de células T o de células presentadoras de antígenos ¹²³.

Por otra parte, un hecho trascendental para un individuo es el contacto directo que tiene la flora intestinal con las células dendríticas especializadas en la presentación de antígenos, las cuales orquestan la homeostasis del sistema inmune de la mucosa.

La composición microbiana y la gran actividad biológica de la micro-biota, provee de señales de maduración al sistema inmune infantil y contribuye a la generación de linfocitos T reguladores, los cuales a través de la Inter-leucina 10 y el Factor de Crecimiento Transformante beta, establecen y mantienen la tolerancia inmune mucosal.

Este fenómeno, “caprichoso” por lo variable y pobremente desarrollado durante la temprana infancia, parece estar involucrado en la prevención de la alergia a alimentos y depender de las características biológicas del individuo y también de la especificidad antigénica de la alergia alimentaria ^{124, 125}.

Hace algunos años un grupo de investigadores, ha sugerido como probable estrategia de prevención, la utilización de péptidos o hidrolizados de leche de vaca tolerogénicos como inductores de tolerancia oral en pacientes de riesgo ^{126, 127}.

También se ha informado que una temprana exposición a proteínas de la leche de vaca como suplemento de la leche materna podría promover tolerancia ¹²⁸.

No obstante, el impacto de la ingesta temprana de diferentes cantidades de proteínas lácteas y su influencia sobre el desarrollo de tolerancia, es desconocido, aunque individuos expuestos a esta circunstancia parecen adquirirla más rápidamente que aquellos que han recibido fórmulas a base de leche de vaca extensivamente hidrolizadas, quizás debido a una antigenicidad residual de estos preparados ¹²⁹.

Por otra parte, la cantidad de antígeno, es determinante del tipo de respuesta inmunológica. Así, la ingestión de continuas dosis bajas promueven la activación de células T reguladoras induciendo una respuesta de tipo supresiva protectora, mientras que altas dosis inducen anergia o apoptosis. Pero, en algunos pacientes, repetidas exposiciones aún a pequeñas cantidades del alimento ofensor, pueden retardar el fenómeno de tolerancia inmunológica ¹³⁰.

En nuestra investigación, la temprana ingesta de proteínas lácteas se asoció con mayor frecuencia con el desarrollo de ALV comparada con la alimentación materna exclusiva, independientemente de la dieta de la madre.

La exposición ambiental al humo de cigarrillo también incidió en el diagnóstico de ALV. Esto sugiere que este factor epi-genético podría estar involucrado en el desarrollo de la enfermedad en las etapas tempranas de la vida, especialmente en individuos genéticamente predispuestos ¹³¹.

En los últimos años se han descrito mutaciones que se han asociado con síndromes clínicos bien definidos.

Las características genéticas del ADNmt, herencia materna, poliplasmia y segregación mitótica, confieren a estas enfermedades propiedades muy particulares. Las manifestaciones clínicas de estas patologías son muy heterogéneas y afectan a distintos órganos y tejidos por lo que su correcto diagnóstico implica la obtención de datos clínicos, morfológicos, bioquímicos y genéticos.

Por otra parte, la investigación de las diferencias genéticas subyacentes, heredadas por individuos predispuestos a la producción de células Th2, en respuesta a alérgenos alimentarios, promete identificar mecanismos involucrados

en determinar el desarrollo de la tolerancia inmunológica o en su defecto la enfermedad alérgica¹³².

En este sentido, la variabilidad clínica observada en la presentación de la ALV, en nuestra investigación, podría explicarse en parte por la presencia de polimorfismos en genes candidatos que influyen en su desarrollo.

El análisis de las variaciones genéticas asociadas con la activación de mecanismos inmunológicos mediados por IgE y el desarrollo de alergia alimentaria, probablemente represente una nueva y esperanzadora línea de investigación para la comprensión adicional de la etiología de la enfermedad.

En un esfuerzo por aclarar los factores de riesgo genéticos para la alergia alimentaria se han realizado una serie de estudios en búsqueda de genes candidatos, que evaluaron las variantes genéticas (alelo) dentro y alrededor de un gen de interés con una enfermedad.

A menudo esto se realiza mediante la comparación de casos afectados con sujetos de control no relacionados ni afectados.

Una profunda comprensión de la patofisiología de la enfermedad es habitualmente necesaria para elegir un gen candidato potencial¹³³.

En este sentido, los genes candidatos para la alergia alimentaria pueden abarcar a los conocidos por estar asociados con asma y eccema, que están estrechamente relacionados con enfermedades atópicas.

Sin embargo, hasta la fecha, las investigaciones sobre estos genes candidatos para el desarrollo de la alergia a los alimentos han tenido muy poco éxito.

Al respecto, se han investigado polimorfismo (s) incluyendo el antígeno del Complejo Mayor de Histocompatibilidad del leucocito humano (HLA clase II familia de genes HLA-DRB1, HLA-DQB1 y HLA-DPB1), grupo de diferenciación 14 (CD14), FOXP3, transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6), inhibidor de la proteasa de serina Kazal tipo 5 (SPINK5), Interleucina-10 (IL-10) y la interleucina-13 (IL-13)¹³⁴.

Cada uno de estos genes fue asociado con la incidencia o la gravedad de la alergia alimentaria en estudios individuales. Sin embargo, la mayoría de estas asociaciones todavía no han podido ser replicadas en poblaciones independientes.

Por otra parte, los factores de riesgo genéticos para el eczema y su asociación con alergia alimentaria a menudo coexisten.

El desafío oral alimentario, doble ciego y controlado con placebo, prueba de oro para el diagnóstico de la patología, demostró que la alergia a los alimentos se encuentra en cerca de 35 – 80% de los niños con moderado a severo eczema¹³⁵.

El gen asociado con eczema más convincente hasta la fecha es el gen filaggrin (agregación de filamentos de proteínas) (FLG), con más de 20 estudios que informaron asociaciones positivas; no obstante, no existen estudios que investiguen la relación entre las mutaciones FLG y el riesgo de desarrollar alergia alimentaria¹³⁶.

En este sentido, las variaciones encontradas en el ADNmt humano determinan los haplogrupos, los cuales trazan la ascendencia matrilineal hasta los orígenes de la especie humana en África y desde allí a su dispersión geográfica global.

Los haplogrupos más antiguos son más grandes y se encuentran más dispersos y de ellos descienden numerosos subgrupos. La migración, dando por resultado el aislamiento de la población, es una de las cuatro fuerzas evolutivas junto a la selección natural, deriva genética y mutación.

La disciplina de genética de la población (Gp), es el estudio de la distribución de frecuencias y del cambio en la variación del gen (alelo) bajo tales influencias¹³⁷.

La Gp observada en poblaciones modernas, ha abierto una ventana en los patrones históricos de migraciones, con una técnica iniciada por Luigi Luca Cavalli-Sforza⁹⁴.

Entre los pueblos europeos que participaron activamente en estas emigraciones masivas hacia América, además de los españoles, podemos citar a los ingleses, portugueses, franceses, alemanes, italianos y holandeses.

Debido a la escasez de mano de obra, sobre todo en el trabajo de las llamadas plantaciones, se importaron esclavos africanos de raza negra procedentes de los países del Golfo de Guinea, lo que cambió nuevamente la composición de la

población y nuevas mezclas raciales: mulatos, zambos, y otras denominaciones que ya no suelen emplearse.

Los descendientes, cada vez más mezclados con los otros grupos raciales, predominaron en las regiones de clima cálido próximas a la costa, donde constituían la mano de obra de las principales haciendas o plantaciones de caña de azúcar, cacao y algodón, entre otros cultivos.

Bajo la forma de colonización, la migración ha transformado el mundo como los establecimientos prehistóricos e históricos de Australia y de las Américas.

La misma teoría de la evolución y el hallazgo de restos fósiles muy antiguos en África, nos da pie para creer que los seres humanos tuvieron un origen común desde donde emigraron en distintas direcciones para irse estableciendo en lugares cada vez más apartados.

Al día de hoy, los países americanos donde en la gran mayoría de su población se observa la presencia o la mezcla con elementos migratorios europeos o de otros continentes son: Estados Unidos, Canadá, Argentina, Brasil, Chile, Cuba, Costa Rica, México, Puerto Rico, Uruguay y Venezuela.

Luego de que los europeos llegaran a América, una parte de los indígenas originarios, fueron desplazados o diezmados y otra gran parte terminó mezclándose con ellos, dando origen al mestizaje, que forma en Hispanoamérica principalmente, la mayor parte de la población actual.

Nuestro estudio, se concentró en conocer además de los haplogrupos nativos en América, qué otros haplogrupos en el ADNmt se presentan en la población estudiada (mediados por la inmigración y el medio ambiente u otros factores) y de qué manera influyen en el desarrollo de la enfermedad ALV.

Para conocer las posibles relaciones genealógicas entre los distintos compases, utilizamos una técnica común en el análisis filogenético que nos ayudara a analizar y visualizar el conjunto de datos obtenidos en el cuadro (matriz) de distancias.

Esta técnica de análisis de datos se basa en la generación de los llamados árboles filogenéticos, que son estructuras geométricas de interconexión que representan la posible relación entre las distintas especies en estudio.

Este tipo de representaciones gráficas tienen la propiedad de que la distancia en el dibujo entre dos nodos refleja tanto como es posible la verdadera distancia entre los dos géneros correspondientes en la matriz de distancias.

Para ello, se introducen nuevos nodos, con el objetivo de obtener un mejor ajuste. Tales nodos (que aparecen sin etiqueta) sugieren la existencia de "generaciones ancestrales" de donde su "descendencia" podría haber surgido.

El común ancestro más reciente es el ADNmt, con quién se alinearon cada uno de los niños estudiados.

Por otro lado, el interrogatorio realizado a sus padres, denuncia un origen ancestral como descendientes de españoles, italianos y criollos.

La presencia del haplogrupo Q que deriva del M y éste del L3 (Africano), en este grupo de niños, indicaría migración que da origen a la diversidad del mestizaje.

Esta variante estaría asociada a haplogrupos europeos, pero se necesitan más estudios para confirmarlo.

Ahora bien, resumiendo lo expresado por numerosos autores, los factores genéticos, epigenéticos y ambientales parecen contribuir al aumento de la incidencia de la alergia alimentaria mediada por IgE, en fases prenatales, perinatales y postnatales.

Entre los que pueden actuar en la etapa prenatal, se mencionan a los antecedentes familiares de atopia, edad materna y paterna, exposición a: antibióticos, probióticos, alimentos complementarios, alimentos alergénicos y la exposición al humo de cigarrillo.

La modificación epi-genética desempeña un importante papel durante los períodos prenatales y perinatales, durante la lactancia a partir de la etapa perinatal, en factores dietéticos del bebé y la exposición a la luz solar, mientras que los contaminantes ambientales y factores relacionados con la hipótesis de la higiene pueden influir sobre el desarrollo de alergia alimentaria en la etapa postnatal ⁶⁴.

En nuestro estudio sobre factores involucrados en el desarrollo de la ALV, señalamos que el sistema respiratorio como única expresión clínica de inicio fue menos afectado en los niños que padecían la enfermedad que en los sanos, mientras que los síntomas correspondientes al sistema gastrointestinal y al dérmico, prevalecieron en los ALV.

Coincidentemente, en la investigación de la influencia de haplogrupos en el desarrollo de la ALV, encontramos que la variante no descrita (cambio nucleotídico T16519C) estuvo presente en los niños que tenían la enfermedad con significancia estadística, en aquellos pacientes que iniciaron la patología con manifestaciones clínicas dérmicas + gastrointestinales, comparados con los que presentaron rinitis y asma y con los sujetos que conformaron el grupo Control.

Capítulo V

CONCLUSIONES

Si bien en este estudio la mayor proporción de varones se dio en los niños ALV, esto solo marcó una tendencia, ya que el género no se asoció significativamente con el diagnóstico de la enfermedad.

La alimentación con leche materna exclusiva hasta el tercer mes de vida, ejerció efecto protector contra el desarrollo temprano de la enfermedad.

Los niños que recibieron fórmulas o fórmulas y leche de madre, tuvieron mayor probabilidad de desarrollar ALV que aquellos alimentados solo con pecho materno.

Se encontró una marcada asociación entre el diagnóstico de ALV y el tipo de manifestaciones clínicas presentes al inicio de la enfermedad.

Concretamente, el sistema respiratorio como única expresión clínica de inicio fue menos afectado en los niños ALV que en los sanos, mientras que los síntomas correspondientes al sistema gastrointestinal y al dérmico, prevalecieron en los ALV.

Los pacientes ALV presentaron con mayor frecuencia manifestaciones clínicas de inicio combinadas (de dos o más tipos) que involucraron a los 3 sistemas antes mencionados.

Se halló un número bajo de niños con enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), sin embargo, esta afección se asoció fuertemente con el diagnóstico de ALV.

Los pacientes ALV iniciaron las primeras manifestaciones clínicas antes que los sanos (controles), tanto a los 3 meses como a los 12 meses de edad, independientemente del tipo de alimentación recibida durante los primeros 3 meses de vida.

La edad de inicio de los primeros síntomas en los niños ALV, fue en promedio a los 8 meses de vida, mientras que para los controles fue en promedio a los 20 meses.

Los niños con antecedentes maternos de alergia, presentaron el doble de posibilidades de desarrollar ALV que aquellos que no los tenían.

La exposición de los niños al humo de cigarrillo durante la etapa prenatal y/o postnatal, incrementó en un 85% la probabilidad de desarrollo de ALV.

Basándonos en los hallazgos más importantes, se puede afirmar que los factores de mayor importancia que de manera conjunta parecen influir en el desarrollo de la ALV, fueron:

- 1) El tipo de alimentación recibida hasta el 3º mes de vida.
- 2) El tipo de manifestaciones clínicas con que comienza la enfermedad.
- 3) La edad de inicio de los síntomas.
- 4) Los antecedentes alérgicos maternos.
- 5) La exposición del niño al humo de cigarrillo.

Estos resultados sirvieron para diseñar distintos tipos de modelos que permiten predecir, para un perfil clínico de paciente determinado y en función de los factores seleccionados, cuál es la probabilidad que tiene el niño de sufrir ALV.

La utilidad de estos perfiles radica en una temprana identificación de pacientes con riesgo, con el fin de realizarle una prueba de desafío oral y de esta forma confirmar el diagnóstico.

En la práctica el índice basado en criterios mayores y menores, identifica fácil y tempranamente, a aquellos pacientes que presenten 2 criterios mayores y al menos 1 menor o 1 mayor y al menos 2 menores como de riesgo para el desarrollo de ALV.

Futuros estudios en esta dirección enriquecidos con la experiencia clínica de médicos que asistan a niños pequeños, permitirán la validación clínica de esta herramienta.

Además, la mutación o variante no descrita (cambio nucleotídico T16519C) estuvo presente con mayor frecuencia en los niños que tenían la enfermedad.

El riesgo de desarrollar ALV fue 3 veces más elevado en los pacientes que poseían la mencionada la mutación.

En los pacientes ALV que iniciaron la enfermedad con manifestaciones clínicas de Dermatitis Atópica (DA) + Enfermedad Gastrointestinal (EGI), la mutación o variante no descrita T16519C, estuvo presente con significancia estadística.

Esto sugiere que esta mutación probablemente aumente la posibilidad de padecer alergia a la leche de vaca asociada con DA+EGI.

Por lo anterior, en el desarrollo de la ALV estarían involucrados además del ADN mitocondrial otros genes nucleares y factores epigenéticos que hacen al fenoma y quizás al proteoma.

Consideramos necesario ampliar esta investigación con el estudio del Genoma mitocondrial completo, con el objetivo de poder correlacionar las variantes de la Región Control D-Loop con el o los haplogrupos correspondientes, lo que resultaría en los haplotipos o subhaplotipos que las caracterizan, tanto para la variante no descrita T16519C como para otras hipotéticas.

Nuevos estudios, en lo posible en diferentes poblaciones y no solo enfocados en el linaje materno sino también en el paterno, contribuirán para un mejor conocimiento de la génesis de la enfermedad.

Capítulo VI

BIBLIOGRAFIA

- 1) Eiroa JJ. *Nociones de Prehistoria General*. Barcelona: Ariel S.A.; 2003. 678 p.
- 2) Childe VG. *Qué sucedió en la historia*. Barcelona: Critica S.A.; 2002. 304 p.
- 3) Salvadó JS, García LP, Sánchez Repollés JM. *La alimentación y la nutrición a través de la historia*. Barcelona: Glosa S.L.; 2005. 488 p.
- 4) American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. *Proposed changes in Food and Drugs Administration regulation concerning formula products and vitamin-mineral dietary supplements for infants*. *Pediatrics* 1967; 40:916-922.
- 5) American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. *Commentary on breastfeeding and infants formula, including proposed standards for formulas*. *Pediatrics* 1976; 57:278-85.
- 6) European Society for Pediatrics Gastroenterology and Nutrition. Committee on Nutrition: I *Recommendations for the composition of an adapted formula*. *Acta Paediatr Scand* 1977; 262:1-25.
- 7) European Society for Pediatrics Gastroenterology and Nutrition. Committee on Nutrition: II *Recommendations for the composition of an adapted formula*. *Acta Paediatr Scand* 1981; 287:1-25.
- 8) OMS. *Manual de resoluciones y decisiones de la Asamblea Mundial de la Salud y del consejo ejecutivo*. Resolución WHO 27, 43:4º ed. Ginebra 1981; 2:58-79.
- 9) Lorente F, Isidoro M, Dávila I, Laffond E, Moreno E. *Update Prevention of allergic diseases*. *Allergol Immunopathol* 2007; 35:151-156.
- 10) Lorente F, Romo A, Laffond E, Davila I. *Preventive measures for allergic diseases*. *Allergol Immunopathol* 1998; 26:101-113.
- 11) Warner JO. *Can we prevent allergies and asthma?* *Allergy Clin Immunol Int : J World Allergy Org* 2004; 16: 186-191.
- 12) Strachan DP. *Family size, infection and atopy: The first decade the hygiene hypothesis*. *Thorax* 2000; 55: 2-10.

- 13) Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: A cross-sectional survey. *Lancet* 2001; 358: 1129-1133.
- 14) Noverr MC, Huffnagle GB. The "microflora hypothesis" of allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1511-1520.
- 15) Rinne M, Kallomaki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E. Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:31-37.
- 16) Rinne M, Kalliomaki M, Salminen S, Isolauri E. Probiotic intervention in the first months of life: short-term effects on gastrointestinal symptoms and long-term effects on gut microbiota. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43:200-205.
- 17) Wesley Burks A, Laubach S, Jones S M. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: Implications for future treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:1344-1350.
- 18) West C E, D'Vaz N, Prescott S L. Dietary immunomodulatory factors in the development of immune tolerance.. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011, 11:325–333
- 19) Arumugan JR, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome 2011. *Nature* 473:174-780.
- 20) Van Duren Schimidt K, Pichler J, Ebner C, et al. Prenatal contact with inhalant allergens. *Pediatr Res* 1997; 41: 128-131.
- 21) Upham JW, Holt BJ, Baron-Hay MJ, Yabuhara A, Hales BJ, Thomas WR, et al. Inhalant allergen-specific T-cell reactivity is detectable in close to 100% of atopic and normal individuals: Covert responses are unmasked by serum-free medium. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 634-642.

- 22) Host A, Halken S. Primary prevention of food allergy in infants who are at risk. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5: 255-259.
- 23) Clough JB. Pre and post-natal events leading to allergen sensitization. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 462-465.
- 24) Vanella LM, Boudet RV, Maldonado AM. Predicción y prevención de atopía. *Bol Alergia Inmunol Clin – Publicación oficial de la Sociedad de Alergia e Inmunología de Córdoba* 1987; 3: 49-53.
- 25) Sicherer SH, Muñoz- Furlong A, Murphy R, Wood RA, Sampson HA. Symposium: Pediatric Food Allergy. *Pediatrics* 2003; 111: 1591-1594.
- 26) Vanella LM, Boudet RV, Maldonado AM. Fisiopatología del asma por alimentos. *Revista Desafío. Publicación del Círculo Médico de Río Cuarto* 1989; 7: 26-33.
- 27) Vanella LM, González Lascano de AM, Boudet RV, Casillas R. Influencia de algunos alimentos sobre el comportamiento inmunológico del niño. *Arch Arg Alerg Inmunol Clin* 1990; 21: 18-32.
- 28) Thornton CA, Holloway JA, Popplewell EJ. Fetal exposure to intact immunoglobulin E occurs via the gastrointestinal tract. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 306-311.
- 29) Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 638-646.
- 30) Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 805-819.
- 31) Osborne NJ, Koplin JJ, Martin PE, Gurrin LC, Lowe AJ, Matheson MC. Prevalence of challenge-proven IgE mediated food allergy using population based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 668-676.

- 32) Jackson M. *Allergy: the making of a modern plague. Clin Exp Allergy* 2001; 31:1665-1671.
- 33) Miller RL, Ho SM. *Environmental epigenetics and asthma: current concepts and call for studies. Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 567-573.
- 34) Bird A. *Perceptions of epigenetics. Nature* 2007; 447: 396-398.
- 35) Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw G.J, Susser ES. et al. *Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 1746-1749.
- 36) Breton CV, Byun HM, Wenten M, Pan F, Yang A, Gilliland FD. *Prenatal tobacco smoke exposure affects global and genes specific DNA methylation. Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 462-467.
- 37) Agarwal S, Rao A. *Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. Immunity* 1998; 9:765-775.
- 38) Jones B, Chen J. *Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. EMBO J* 2006; 25:2443-2452.
- 39) Liu J, Ballaney M, Al-alem U, Quan C, Jin X, Perera F, et al. *Combined inhaled diesel exhaust particles and allergen exposure alter methylation of T helper genes and IgE production in vivo. Toxicol Sci* 2008; 102:76-81.
- 40) Groom A, Elliott HR, Embleton ND, Relton CL. *Epigenetics and child health: basic principles. Arch Dis Child* 2011; 96: 863-869.
- 41) Martino D, Prescott S. *Epigenetics and Prenatal Influences on Asthma and Allergic Airways Disease. CHEST* 2011; 139: 640-647.
- 42) Fiocchi A, et al. *World Allergy Organization. Diagnosis and Rationale against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. World Allergy Organization Journal* 2010; 3:57-161.
- 43) Nowak-Wegrzyn A. *Future approaches to food allergy. Pediatrics* 2002; 111: 1672-1680.

- 44) Brandtzaeg PE. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 964:13-45.
- 45) Sampson HA. Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 717-729.
- 46) Björkstén B. Genetic and environmental risk factors for the development of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:249-253.
- 47) Sampson HA. Update of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 805-819.
- 48) Sampson HA. Food allergy. Part 2: Diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:981-989.
- 49) Bock SA. Diagnostic evaluation. *Pediatrics* 2003; 111:1638-1644.
- 50) Hamilton RG, Adkinson NF. In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 213-225.
- 51) Beyer K, Teuber SS. Food allergy diagnostics: Scientific and unproven procedures. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5: 261-266.
- 52) Poulsen LK. In search of a new paradigm: mechanisms of sensitization and elicitation of food allergy. *Allergy* 2005; 60: 549-558.
- 53) Hamburger RN, ed. Introduction: A brief history of food allergy with definition of terminology in food intolerance. *Food Intolerance in infancy: Allergology, Immunology, and Gastroenterology*. New York: Raven Press, 1989: 1-6.
- 54) Host A. Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy. Some clinical, epidemiological and immunological aspects. *Pediatr Allergy Immunol* 1994; 5: 5-36.
- 55) Bock SA, Sampson HA. Evaluation of food allergy. En: Leung D, Sampson HA, Geha R, Szefer S. *Pediatric allergy: principles and practice*. 2nd edition. Saunders Elseviers; 2010: 477-486.

- 56) Huang S W. *Follow-up of children with rhinitis and cough associated with milk allergy. Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18: 81-85.
- 57) Alonso Lebrero E, Fernandez Moya L, Somoza Alvarez ML. *Alergia a la leche y huevo en niños. Alergol Inmunol Clin* 2001; 16: 96-115.
- 58) James JM, Sampson HA. *Immologic changes associated with the development of tolerance in children with cow milk allergy. J Pediatr* 1992; 121: 371-377.
- 59) Vanella LM. *La leche de vaca como factor de sensibilización en la infancia. Tesis doctoral Universidad Nacional de Córdoba* 1973.
- 60) Wood RA. *The natural history of food allergy. Pediatrics* 2003; 111: 1631-1637.
- 61) Chedane M, Mayer LL. *Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 3-12.
- 62) Strobel S, Mowat AM. *Oral tolerance and allergic responses to food proteins. Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6: 207-213.
- 63) Branum AM, Lukacs SL. *Food allergy among children in the United States. Pediatrics* 2009; 124:1549-1555.
- 64) Tan N TH, Ellis JA, Saffery R, Allen KJ. *The role of genetics and environment in the rise of childhood food allergy. Clin Exp Allergy* 2012; 42:20-29.
- 65) Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, et al. *The prevalence of food allergy: a meta-analysis. J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:638-646.
- 66) Hourihane JO, Dean TP, Warner JO. *Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges. BMJ*1996; 313:518-521.

- 67) Tsai HJ, Kumar R, Pongracic J. Familial aggregation of food allergy and sensitization to food allergens: a family-based study. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:101-109.
- 68) Umetsu DT, DeKruyff RH. TH1 and TH2 CD41 cells in human allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:1-6.
- 69) Ortolani C, Pastorello EA. Food allergies and food intolerances. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20:467-483.
- 70) Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 1999; 238:211-230.
- 71) Torroni A, Wallace DC. Mitochondrial DNA variation in human populations and implications for detection of mitochondrial DNA mutations of pathological significance. *J Bioenerg Biomembr* 1994; 26:261-271.
- 72) Brown MD, Torroni A, Reckord CL, Wallace DC. Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA's indicates multiple independent occurrences of the common mutations. *Hum Mutat* 1995; 6:311-225.
- 73) Kofler B, Mueller EE, Eder W, Stanger O, Maier R, Weger M, Hass A, et al. Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Med Genet* 2009; 10:35-42.
- 74) Kumar R, Tsai HJ, Hong X, Gignoux C, Pearson C, Ortiz K, et al. African ancestry, early life exposures, and respiratory morbidity in early childhood. *Clinical and Experimental Allergy* 2012; 42:265-274.
- 75) Wakeley J. Substitution rate variation among sites in hypervariable region 1 of human mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 1993; 37:613-623.

- 76) Rieder MJ, Tayler SL, Tobe VO, Nickerson, DA. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: Analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 967-973.
- 77) Piazza A, Rendine S, Minch E, Menozzi P, Mountain J, Cavalli-Sforza L L. Genetics and the origin of European languages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 5836-5840.
- 78) Fagundes N, Kanitz R, Eckert R, Valls A, Bogó M, Salzano F, et al. Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *The American Journal of Human Genetics* 2008; 82: 583-592.
- 79) Goebel T. The "Microblade Adaptation" and Recolonization of Siberia during the Late Upper Pleistocene. *Archeological Papers of the American Anthropological Association* 2002; 2:117-131.
- 80) Goebel T, Waters, M, and Dikova M. The archaeology of Ushki Lake, Kamchatka, and the Pleistocene peopling of the Americas. *Science* 2003; 301: 501-505.
- 81) Vasil'ev S, Kuzmin Y, Orlova L, and Dementyev V. Radiocarbon-based chronology of the Paleolithic in Siberia and its relevance to the peopling of the NewWorld. *Radiocarbon*. 2002; 44: 503-530.
- 82) Rogers R, Rogers L, Hoffmann R, and Martin L. Native American biological diversity and the biogeographic influence of Ice Age refugia. *J. Biogeogr.* 1991; 18: 623-630.
- 83) Volodko NV, Starikovskaya, EB, Mazunin IO, Eltsov NP, Naidenko PV, Wallace DC and Sukernik RI. Mitochondrial Genome Diversity in Arctic Siberians, with Particular Reference to the Evolutionary History of Beringia and Pleistocenic Peopling of the Americas. *The American Journal of Human Genetics* 2008; 82:1084-10100.

- 84) Dixon EJ. Human colonization of the Americas: Timing, technology and process. *Quaternary Science Reviews* 2001; 20: 277-299.
- 85) Wakeley J. Substitution rate variation among sites in hyperKingman J F C. Exchangeability and the evolution of large variable region 1 of human mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 1993; 37: 613-623.
- 86) Dornelles CL, Bonatto SL, Freitas LB, and Salzano FM. Is haplogroup X present in extant South American Indians? *Am. J. Phys. Anthropol.* 2005; 127: 439-448.
- 87) Fagundes N, Kanitz R, Eckert R. Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *Book: Biomolecular Archaeology* 2008; 284-286.
- 88) Tajima F. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics* 1996; 143: 1457-1465.
- 89) Yun-Xin F and Wen-Hsiung L. Statistical Tests of Neutrality of Mutations *Genetics* 1993; 133: 693-709.
- 90) Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Mondragon-Palomin M, Procaccio V, Gaut B, Wallace DC. Adaptive selection of mitochondrial complex I subunits during primate radiation *Gene* 2006; 378:11-18.
- 91) Forster P, Harding R, Torroni A, Bandelt HJ. Origin and evolution of Native American mtDNA variation: A reappraisal. *Am J Hum genet* 1996; 59: 935-945.
- 92) Saillard J, Forster P, Lynnerup N, Bandelt HJ, Norby S. Mitochondrial DNA variation among Greenland Eskimos: the edge of the Beringian expansion. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 718-26.
- 93) Relethford J. Genetic evidence and the modern human origins debate. *Heredity* 2008; 100: 555-63.

- 94) Cavalli-Sforza LL, Piazza A, Menozzi P, Mountain J. Reconstruction of human evolution: Bringing together genetic, archaeological, and linguistic data. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988; 85: 6002-6.
- 95) Maher B A. Uprooting the Tree of Life. *The Scientist* 2002; 16:18-16.
- 96) Hodge T, Cope M J T V. A Myosin Family Tree. *Journal of Cell Science* 2000; 113: 3353-54.
- 97) Swiderski DL, Zelditch ML, Fink WL. Why morphometrics is not special: coding quantitative data for phylogenetic analysis. *Syst Biol* 1998; 47: 508-19.
- 98) Ratner VA, Zharkikh AA, Kolchanov NA, Rodin SN, Solovyov VV, Antonov AS. *Molecular Evolution. Biomathematics Series* 1996; 24: 433.
- 99) Jukes TH, Cantor CR. *Evolution of Protein Molecules.* New York: Academic Press. 1969; 21-132.
- 100) Kimura M. "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences". *Journal of Molecular Evolution* 1980; 16: 111-20.
- 101) Isolauri E, Tahvanainen A, Peltola T, Arvola T. Breast-feeding of allergic infants. *J Pediatr* 1999; 134: 5-7.
- 102) Vadas P, Wai Y, Burks W, Perelman B. Detection of peanut allergens in breast milk of lactating women. *JAMA* 2001; 285: 1746-1748.
- 103) Saarinen K, Juntunen Backman K, Jarvenpaa AL, Kultunen P, Lope L, Renlund N, et al. Supplementary feeding in maternity hospitals and the risk of cow's milk allergy: a prospective study of 6209 infants. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 457-461.

- 104) Verhasselt V. Neonatal tolerance under breastfeeding influence. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 623-630.
- 105) Vanella LM, González Lascano AM de, Boudet RV, Casillas R. Influencia de algunos alimentos sobre el comportamiento inmunológico del niño. *Arch Arg Alerg Inmunol Clin* 1990; 21:18-32.
- 106) Hùst A, Halken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity. *Allergy* 1990; 45: 587-596.
- 107) Eller E, Kjaer HF, Høst A, Andersen K, Bindslev-Jensen C. Food allergy and food sensitization in early childhood: results from the DARC cohort. *Allergy* 2009; 64: 1023-1029.
- 108) Vanella LM, Boudet RV. ¿La lactancia materna protege contra la enfermedad alérgica? *Alerg Inmunol Clin* 2003; 20: 6-12.
- 109) Kull I, Almqvist C, Lilja G, Pershagen G, Wickman M, et al. Breast-feeding reduces the risk of asthma during the first 4 years of life. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 755-760.
- 110) Terracciano L, Isoardi P, Arrigoni S, Zoja A, Martelli A, et al. Use of hydrolysates in the treatment of cow's milk allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89: 86-90.
- 111) Van Odijk J, Kull I, Borres MP, Brandtzaeg P, Edberg U, Hanson LÅ, et al. Breastfeeding and allergic disease: A multidisciplinary review of the literature (1966-2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. *Allergy* 2003; 58: 833-843.
- 112) Johnstone DE, Dutton AM. Dietary prophylaxis of allergic diseases in children. *N Engl J Med* 1996; 274: 715-719.

- 113) Businco L, Dreborg S, Einarsson R, Giampietro PG, Hest A, Keller, K, et al. Allergenicity and nutritional adequacy of soy protein formulas. *J Pediatr* 1992; 121: 21-22.
- 114) Fiocchi A, Terracciano L, Bouygue GR, Veglia F, Sarratud T, Martelli A, et al. Incremental prognostic factors associated with cow's milk allergy outcomes in infant and child referrals: the Milan Cow's Milk Allergy Cohort study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 101:166-173.
- 115) Salvatore S, Vandenplas Y. Gastroesophageal reflux and cow milk allergy: is there a link? *Pediatrics* 2002; 110: 972-984.
- 116) Borrelli O, Mancini V, Thapar N, Giorgio V, Elawad M, Hill S, et al. Cow's milk challenge increases weakly acidic reflux in children with cow's milk allergy and gastroesophageal reflux disease. *J Pediatr* 2012; 161: 476-481.
- 117) Bock SA, Sampson HA, Food allergy in infancy. *Pediatr Clin North Am* 1994; 41:1047-1067.
- 118) Hùst A, Halken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity. *Allergy* 1990; 45: 587-596.
- 119) Eller E, Kjaer HF, Høst A, Andersen K, Bindslev-Jensen C. Food allergy and food sensitization in early childhood: results from the DARC cohort. *Allergy* 2009; 64:1023-1029.
- 120) Hourihane JO, Dean TP, Warner JO. Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges. *BMJ* 1996; 313: 518-521.
- 121) Tsai HJ, Kumar R, Pongracic J. Familial aggregation of food allergy and sensitization to food allergens: a family-based study. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 101-109.

- 122) Liu X, Zhang S, Tsai HJ, Hong X, Wang B, Fang Y, et al. Genetic and environmental contributions to allergen sensitization in a Chinese twin study. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 991-998.
- 123) Umetsu DT, DeKruyff RH. TH1 and TH2 CD41 cells in human allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 1-6.
- 124) Ortolani C, Pastorello EA. Food allergies and food intolerances. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 467-483.
- 125) Brandtzaeg PE. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 964: 13-45.
- 126) Pecquet S, Bovetto L, Maynard F, Fritsché R. Peptides obtained by tryptic hydrolysis of bovine beta-lactoglobulin induce specific oral tolerance in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 514-521.
- 127) Elsayed S, Hill DJ, Do TV. Evaluation of the allergenicity and antigenicity of bovine-milk alpha1-casein using extensively purified synthetic peptides. *Scand J Immunol* 2004; 60: 486-493.
- 128) Katz Y, Rajuan N, Goldberg MR, Eisenberg E, Heyman E, Cohen A, et al. Early exposure to cow's milk protein is protective against IgE-mediated cow's milk protein allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 126: 77-82.
- 129) Terracciano L, Bouygue GR, Sarratud T, Veglia F, Martelli A, Fiocchi A. Impact of dietary regimen on the duration of cow's milk allergy: a random allocation study. *Clin Exp Allergy*. 2010; 40:637-642.
- 130) Nowak-Wegrzyn A. Future approaches to food allergy. *Pediatrics* 2002; 111: 1672-1680.
- 131) Dotterud CK, Storrø O, Simpson MR, Johnsen R, Øien T. The impact of pre and postnatal exposures on allergy related diseases in childhood: a controlled multicentre intervention study in primary health care *BMC Public Health* 2013; 13-123.

- 132) Bedoret D, Singh AK, Shaw V, Hoyte EG, Hamilton R, DeKruyff RH, et al. *Changes in antigen-specific T cell number and function during oral desensitization in cow's milk allergy enabled with omalizumab. Mucosal Immunol. 2012; 5: 267-276.*
- 133) Kwon JM, Goate AM. *The candidate gene approach. Alcohol Res Health 2000; 24:164–8.*
- 134) Bailey KR, Cheng C. *Conference scene: the great debate: Genome-wide association studies in pharmacogenetics research, good or bad? Pharmacogenomics 2010; 11:305–8.*
- 135) Niggemann B, Sielaff B, Beyer K, Binder C, Wahn U. *Outcome of double-blind, placebo-controlled food challenge tests in 107 children with atopic dermatitis. Clin Exp Allergy 1999; 29:91–6.*
- 136) Van den Oord RA, Sheikh A. *Filaggrin gene defects and risk of developing allergic sensitisation and allergic disorders: systematic review and metaanalysis. BMJ 2009; 339:b2433*
- 137) Rieder MJ, Tayler SL, Tobe VO, Nickerson DA. *Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: Analysis of the human mitochondrial genome. Nucleic Acids Res. 1998; 26: 967-973.*

ANEXO

DOCUMENTACIÓN

1. *Certificación del origen de las historias clínicas de los pacientes estudiados en esta tesis.*
(pág.107)
2. *Certificación de realización en el laboratorio de la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.*
(pág. 108)
3. *Premio al Mejor Trabajo en Investigación presentado en formato poster. Otorgado por la Asociación Argentina de Alergia e Inmunología año 2013.*
(pág. 109)
4. *Abstract GMED 9, Comunicaciones Libres | gmed (genética médica). journal of basic & applied genetics, 2013: 24 (1),133.*
(pág. 110)
5. *Abstract #11731, aceptado para presentación en formato poster en el AAAAI Annual Meeting, Feb 28 to Mar 4, 2014, San Diego, CA, EU.*
(pág. 111)



MINISTERIO DE SALUD
NUEVO HOSPITAL RÍO CUARTO S.A. DE P.

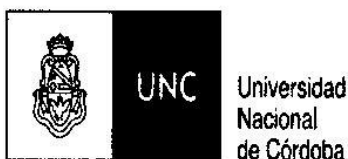
----- El que suscribe, Dr. Héctor Antonio Schiaroli Director del Nuevo Hospital Río Cuarto “San Antonio de Padua”, **DEJA CONSTANCIA:** que el Dr. Raúl Vicente BOUDET, DNI N° 11.689.444 - Médico Cirujano - MP N° 12.968, se desempeñó como Médico en el Servicio de Alergia e Inmunología en el ex Hospital San Antonio de Padua de la ciudad de Río Cuarto, desde el 11-12-1991 hasta el 08-11-1993 inclusive, momento en el cual se unificó éste nosocomio con el Hospital Central Río Cuarto.-----

----- -Se hace constar que el Dr. Boudet tenía acceso a las historias Clínicas de los hospitales anteriormente mencionados.-----

----- A los fines que hubiere lugar, se expide la presente en la ciudad de Río Cuarto, a los diecisiete de febrero de dos mil catorce.-----



MUEVO HOSPITAL
SAN ANTONIO DE PADUA
HECTOR ANTONIO SCHIAROLI
Director



Certifico que el Sr. Médico Raúl Vicente Boudet, en calidad de Doctorando, su Tesis Doctoral con tema "Influencia del tipo de alimentación en el desarrollo de la alergia a la leche de vaca en niños pequeños. Factores involucrados en el proceso por el cual se adquiere la enfermedad". Ha realizado pasantía en la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, desde el 31 de Marzo del año 2012 al 20 de Diciembre del año 2013. Para completar estudios en relación a su Tesis Doctoral, el cual fue el estudio de la región control en el ADN mitocondrial (haplogrupos mitocondriales), en niños con alergia a la proteína de la leche de vaca y controles. Los resultados obtenidos fueron presentados en el XXXVI Congreso anual Asociación Argentina de Alergia e Inmunología Clínica, tema: "Influencia de haplogrupos mitocondriales en niños con alergia a la leche de vaca" Autores: Boudet, RV; Chaig, RV; Chaig, MR; Gerez de Burgos, MN; Muiño, JC; Copioli, JC. El cual obtuvo el Premio al mejor trabajo de presentación libre. También se presentó un trabajo en el Congreso de la Sociedad Argentina de Genética, Salta, año 2013. Tema: Estudio de la región control ADN mitocondrial en niños con alergia a la leche de vaca. Autores: María Rosa Chaig, Raúl V Boudet, R V Chaig, Nelia M Gerez de Burgos, Juan C Muiño, Juan C Copioli.

Se extiende el certificado a 20 días del mes de Diciembre de 2013.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Rosa Chaig'.

Prof. Dra. María Rosa Chaig

Asesora en Investigación

Genética Molecular

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'N. M. Gerez de Burgos'.

Prof. Dra. Nelia M Gerez de Burgos

Integrante de la Comisión de Tesis Doctoral

Buenos Aires, 16 de Agosto de 2013

Señor

Dr. Raúl V. Boudet,

S / D

Estimado Dr. Boudet,

La Asociación Argentina de Alergia e Inmunología Clínica tiene el agrado de informarle que el trabajo titulado *"Influencia de haplogrupos mitocondriales en niños con alergia a la leche de vaca"*, de los autores: **Boudet, RV; Chaig, RDV; Chaig, MR; Gerez de Burgos, NM; Muiño, JC; Copioli, JC**, ha sido declarado ganador del Premio al Mejor Trabajo Libre presentado en Formato Póster otorgado durante el XXXVI Congreso Anual AAAeIC. Nuestras más sinceras felicitaciones a usted y todo el equipo de trabajo.

Sin otro particular, saludan atentamente

Débora J. Seigelshifer

Secretario General

AAAeIC

Gabriel Gattolin

Presidente

XXXVI Congreso Anual

Iris V. Medina

Presidente

AAAeIC

ESTUDIO DE LA REGIÓN CONTROL ADN MITOCONDRIAL EN NIÑOS CON ALERGIA A LA LECHE DE VACA.

Chaig MR1, RV Boudet1,2, RV Chaig1, JC Muiño3, NM Gerez de Burgos1, JC Copioli4. 1Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular. FCM-UNC, 2Hospital zonal de Río Cuarto - Córdoba, 3UHMI N°4 Medicina III. FCM-UNC, 4UHMI N°3. Medicina III. FCM-UNC.

e-mail: mrchaig@hotmail.com

La alergia a los alimentos es un problema de salud pública, a nivel global. La historia familiar es un potente factor de riesgo para el desarrollo de la alergia alimentaria. Los haplogrupos mitocondriales específicos para una población pueden ser funcionalmente diferentes y ejercer influencias en la enfermedad. El objetivo de nuestro trabajo fue: caracterizar mutaciones específicas de la Región D-Loop del ADNmt en un grupo de niños con alergia a la proteína de la leche de vaca (APLV), con el fin de arribar a un mejor conocimiento biológico, genético heredable y etiológico de la enfermedad. Se estudiaron 41 niños de 0 a 2 años de edad y de ambos sexos, que viven en la ciudad de Río Cuarto, Córdoba Argentina; 11 de ellos tenían diagnóstico APLV y 30 sanos. La región D-Loop HVI, II y III del genoma mitocondrial, fue amplificado por reacción en cadena de la polimerasa, utilizando "primers" específicos y secuenciados. El análisis filogenético fué calculado usando el programa CLUSTAL OMEGA, el Neighbor-Joining, BLOSUM62 con datos estudiados y registrados por Jukes-Cantor y luego con Kimura-2. El grado de asociación de haplogrupos con la población enferma es mínimo, no significativo, lo que indica que los haplogrupos en esta población no influirían en la enfermedad. La variante T16519C, no está descripta, pero en nuestra población enferma tiene alta prevalencia y podríamos decir que la probabilidad de enfermarse teniendo esta variante existe. Además de ADNmt, otros genes nucleares y factores epigenéticos podrían estar involucrados en el desarrollo de APLV.

Abstract #11731**The Relationship Between Mitochondrial Haplogroups Variant On Children With Cow Milk Allergy Expressed As Atopic Dermatitis and Gastrointestinal Disease**

Dr. Juan Carlos Muino, MD PhD FAAAAI¹, Dr. Raul Boudet¹, Dr. Maria Chaig¹, Dr. Roberto Chaig¹, Prof. Nelida Gerez² and Prof. Juan Carlos Copioli¹, (1)FAC CS MED UNC, Cordoba, Argentina, (2)FAC CS MED UNC, Córdoba, Argentina.

Rationale: Genotypes associated to cow's milk allergy are unknown. They have not been replicated in independent population, and could be responsible for the marked variability in individual clinical response to cow milk proteins.

Methods: The objective was to characterize haplogroups of the D-Loop region of mitochondrial DNA in a group of children allergic to cow's milk in order to arrive to a better knowledge of biological and genetic heritability in the etiology of the disease. We studied 41 children of both sex aged 0-2 years, 11 allergic to cow's milk demonstrated by challenge and 30 healthy subjects (controls), from the urban area of Rio Cuarto City, Córdoba, Argentina. We performed Analysis of variants of D-loop region of the mitochondrial genome. The D-Loop region HVI, II and III of the mitochondrial genome was amplified by PCR, for which we used specific primers. Phylogenetic analysis was calculated using the program CLUSTAL OMEGA, the Neighbor-Joining, BLOSUM62 with data studied and recorded by Jukes-Cantor and then with Kimura-2

Results: The cow milk allergic patients were divided in: (a) Atopic Dermatitis (AD) + Gastrointestinal Disease (GID) (n: 6) and (b) Rhinitis and Asthma (n: 5). We found the non described variant in transition of haplogroups, T16519C associated with (a) in 6/6 cases when compared with (b) negative in 5/5 cases and the control group (6/30), p= 0, 0312, RR: 2,900

Conclusions: These features suggest that this variant probably increases the possibility of suffering cow milk allergy associated with AD +GID