

# ESTUDIO CLINICO SOBRE LA INFLUENCIA DEL CONSUMO DE LECHE DE VACA EN LA APARICION DE SINTOMAS DE RINITIS ALERGICA

<u>INDICE</u>	<u>Pag.</u>
<b>RESUMEN</b>	2
<b>1. INTRODUCCION - PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	4
<b>3. OBJETIVOS</b>	5
<b>3. DISEÑO</b>	5
<b>4. HIPOTESIS DE TRABAJO</b>	6
<b>5. PACIENTES Y METODOS</b>	6
5.1. ÁMBITO DEL ESTUDIO	6
5.2. TAMAÑO MUESTRAL	6
5.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	6
5.4. VARIABLES	7
5.5. SELECCIÓN Y ALEATORIZACIÓN DE SUJETOS	7
5.6. DESARROLLO DEL ESTUDIO	8
5.7. REGISTRO Y TRATAMIENTO DE DATOS	9
5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	9
5.9. VALORACIÓN Y CONTROL DE SESGOS	10
5.10. CONSENTIMIENTO – CONSIDERACIONES ÉTICAS	12
5.11 BÚSQUEDA BIBLIOGRAFICA	12
<b>6. RESULTADOS</b>	13
<b>7. DISCUSION</b>	17
7.1. DISCUSION DE LOS OBJETIVOS	17
7.2. DISCUSION DEL DISEÑO DEL ESTUDIO Y DE HIPOTESIS DE TRABAJO	18
7.3. DISCUSION DE LOS PACIENTES Y METODOS	19
7.4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS	27
<b>8. CONCLUSIONES</b>	32
<b>9. ANEXOS</b>	33
<b>10. BIBLIOGRAFIA</b>	41

## **RESUMEN**

La rinitis alérgica (RA) es una enfermedad de gran prevalencia, un 10 – 15% en la población general, con múltiples factores desencadenantes.

Conocemos la importancia del consumo de leche de vaca como provocador de reacciones de hipersensibilidad, en pacientes con alergia alimentaria a los componentes de la leche de vaca.

Lo que no está demostrado, es su influencia, en la aparición de episodios de rinitis alérgica sin alergia a la leche de vaca, como alimento.

### **OBJETIVOS:**

Principal: comprobar la influencia del consumo de leche de vaca, en pacientes sin alergia a éste alimento, en la aparición de episodios de rinitis alérgica.

Secundarios: Identificar la frecuencia de síntomas asociados a la rinitis alérgica en dichos pacientes y cuantificar la aparición de episodios de otras enfermedades atópicas (dermatitis atópica y asma) en los pacientes del estudio.

### **PACIENTES Y METODOS:**

Utilizamos un estudio de intervención, abierto y controlado con asignación aleatoria de pacientes diagnosticados de rinitis alérgica, mediante test cutáneo, y que no presentaran alergia alimentaria a la leche de vaca. La intervención, consiste en la restricción dietética de la leche de vaca.

### **RESULTADOS:**

Se incluyeron 35 pacientes en el control y 35 pacientes en el grupo de intervención.

Se comprueba que al inicio del estudio, ambos grupos, son comparables.

En relación al objetivo principal, tras un año de seguimiento, finalizan el estudio 32 pacientes del grupo control y 31 del grupo de intervención, presentando episodios de rinitis alérgica, un 57,14% de los pacientes incluidos en el grupo control y un 2,85% de los pacientes en el grupo de intervención, lo que supone un intervalo de confianza al 95% de la diferencia de 0,54 +/- , - 0,17 y una p= 0,001, es decir, diferencia significativa.

En relación a los objetivos secundarios, se observa, diferencia significativa en la aparición de síntomas de rinitis alérgica, en el caso del asma no existe diferencia significativa entre ambos grupos, mientras que para la dermatitis atópica, sufren la enfermedad un 20% de los pacientes del grupo control y un 2,85% de los pacientes incluidos en el grupo de intervención, lo que nos da un intervalo de confianza al 95% de la diferencia de los 0,26 +/- 0,16 y una  $p= 0,01$ .

### **CONCLUSIONES:**

La evitación del consumo de leche de vaca, en la dieta de pacientes con rinitis alérgica, sin alergia alimentaria, consigue disminuir la frecuencia de episodios de rinitis alérgica y sus síntomas asociados.

También disminuye la frecuencia de aparición de crisis de dermatitis atópica. No presenta influencia en cuanto a la evolución de asma en el periodo de estudio.

### **PALABRAS CLAVE**

Rinitis alérgica, Asma, Dermatitis Atópica, Alergia, Leche de Vaca, Rhinitis Allergic, Asthma, Dermatitis Atopic, Allergic, Cow Milk.

## **1. INTRODUCCIÓN- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La Rinitis Alérgica (RA) ó alergia nasal es una inflamación de la mucosa nasal y/o conjuntival caracterizada por estornudos, rinorrea, prurito nasal y/o conjuntival, y obstrucción nasal<sup>1</sup>.

Es el padecimiento alérgico más frecuente, a cualquier edad<sup>2</sup>. Se calcula que aproximadamente un 10 a 15 % de la población general la padece<sup>2</sup>.

Dependiendo de la intensidad, puede ser incluso incapacitante y en general, suele disminuir la calidad de vida, aunque por sí mismo el padecimiento no es peligroso.

La asociación de rinitis alérgica con otros cuadros relacionados con reacciones de hipersensibilidad como sinusitis, otitis media con derrame y asma bronquial es muy elevada,

Ocasiona numerosos gastos farmacéuticos, así como una considerable pérdida económica por absentismo laboral<sup>3,4</sup>.

Sin embargo, la investigación epidemiológica sobre RA es limitada y su etiología no es bien conocida, por lo que se la considera de origen y desarrollo multifactorial<sup>5</sup>.

En los últimos años, se está haciendo un gran esfuerzo para volver a clasificar la RA desde los aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos, destacando el ISAAC<sup>6</sup> iniciado en 1995 y la nueva clasificación presentada por Bousquet<sup>7</sup> et al, en 2001, incidiendo especialmente en la gran relación que existe entre la RA, como factor de riesgo del asma.

Las pruebas cutáneas son la herramienta diagnóstica principal en el diagnóstico de la rinitis alérgica

Uno de los muchos factores que hay que tener en cuenta en la RA es, como no podía ser menos, la relación del individuo con su medio ambiente y dentro de este aspecto, la alimentación del paciente afecto de RA<sup>6</sup>.

En la bibliografía, podemos encontrar multitud de estudios que se refieren bien a la intolerancia o alergia, a algún componente de la leche de vaca, como por ejemplo la lactosa<sup>8,9,10</sup>, a la galactosa<sup>11</sup> o las proteínas de la leche de vaca, u otros muchos estudios que relacionan el consumo de leches adaptadas versus leche materna, en lactantes y su repercusión en el desarrollo de enfermedades alérgicas por éstos niños<sup>12,13</sup>, pero no hemos encontrado ningún estudio concluyente, que nos aclare la influencia del consumo de leche de vaca, en pacientes aquejados por RA y que no sufran una verdadera intolerancia a algún componente de la leche (lactosa, proteínas lácticas)<sup>14,15</sup>, por lo tanto, no conocemos, hasta el momento que influencia puede provocar el consumo de este alimento en la frecuencia o intensidad de crisis de RA en pacientes que no sufren una intolerancia a la leche de vaca o alguno de sus componentes.

El objetivo principal del estudio, fue comprobar si el consumo de leche de vaca, en la dieta, influía sobre la aparición de episodios de RA, en pacientes que han sido diagnosticados mediante

pruebas inmunológicas de RA y unos objetivos secundarios consistentes en intentar identificar la frecuencia de aparición de síntomas de RA a lo largo del estudio en ambos grupos, así como valorar la sintomatología concomitante en ambos grupos a estudio, en relación a otras enfermedades atópicas, como son el Asma y la Dermatitis Atópica.

Por lo tanto, el factor de estudio, es el consumo de leche de vaca en pacientes con RA, el criterio de evaluación o variable de respuesta con la que pretendemos medir el efecto de la intervención, en nuestro caso será la aparición de episodios de RA y la población de estudio son pacientes afectados de RA.

## **2. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO ESPECIFICO O PRINCIPAL**

El objetivo específico es comprobar si el consumo de leche de vaca, en la dieta, influye sobre la aparición de episodios de RA, en pacientes que han sido diagnosticados mediante pruebas inmunológicas de RA.

En este punto, es preciso definir los siguientes elementos<sup>16</sup>:

1. Factor de estudio, es en nuestro caso el consumo de leche de vaca en pacientes con RA.
2. El criterio de evaluación o variable de respuesta con la que pretendemos medir el efecto de la intervención, en nuestro caso será la aparición de episodios de RA.
3. La población de estudio son pacientes afectados de RA.

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- Identificar la frecuencia de aparición de síntomas de RA a lo largo del estudio en ambos grupos.
- Valorar la sintomatología concomitante en ambos grupos a estudio, en relación a otras enfermedades atópicas, como son el Asma y la Dermatitis Atópica.

## **3. DISEÑO DEL ESTUDIO**

En nuestro caso, nos proponemos evaluar la eficacia de una intervención terapéutica, por lo tanto planteamos un diseño de intervención tipo "ensayo clínico aleatorio"<sup>17</sup>, ya que desde el punto de vista epidemiológico, es la herramienta más potente disponible que nos permite correlacionar la intervención y la respuesta clínica observada.

En cuanto a la intervención, esta será evitar el consumo de leche de vaca a los pacientes incluidos en el que llamaremos "grupo de intervención", mientras se permitirá continuar consumiéndola, normalmente, a los pacientes incluidos en el que llamaremos "grupo control".

Dadas las características de la intervención, no se utiliza placebo y se propone un estudio de tipo "abierto"<sup>17</sup>.

Así pues, se trata de un estudio de intervención, abierto y controlado, con asignación aleatoria de pacientes que cumplen los criterios de inclusión / exclusión.

#### **4. HIPOTESIS DE TRABAJO**

Tras distribuir aleatoriamente a los pacientes con RA, como se detallará más adelante, en los grupos control y de intervención respectivamente, y una vez aplicada la intervención (suprimir leche de vaca en la dieta), se plantea:

1. Hipótesis nula ( $H_0$ )<sup>18</sup>: no se observa diferencia en la respuesta (episodios de RA) entre ambos grupos.
2. Hipótesis alternativa ( $H_1$ )<sup>18</sup>: se aprecia diferencia la respuesta entre ambos grupos

#### **5. PACIENTES Y METODOS:**

##### **5. 1. ÁMBITO DE ESTUDIO:**

Consulta de medicina naturista y homeopatía, situada en la ciudad Alicante, España.

##### **5. 2. TAMAÑO MUESTRAL**

Para el cálculo del número de pacientes que han de componer la muestra, utilizaremos las tablas para el cálculo del número de sujetos necesarios en cada grupo para la comparación de dos proporciones<sup>19</sup>, encontrando que, asumiendo un contraste de hipótesis unilateral con una  $p_1=0.5$ , una  $p_2=0.85$ , un  $\alpha=0.05$ , y una potencia  $(1-\beta)=0.8$ , se precisan 21 sujetos por grupo.

Contando con un 25% de pérdidas en el seguimiento tendríamos que reclutar un mínimo de 27 – 30 pacientes por grupo.

##### **5. 3. CRITERIOS DE INCLUSION Y DE EXCLUSION.**

Los criterios de inclusión, fueron los siguientes:

1. Pacientes diagnosticados de Rinitis Alérgica (siguiendo los postulados internacionales sobre el diagnóstico de la RA)<sup>6,7,20</sup>
2. Pacientes que aporten Test cutáneos positivos<sup>20</sup>.
3. Pacientes que manifiesten consumir leche de vaca, en su dieta habitual.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

1. Pacientes de mas de 75 años o menos de 7 años de edad.
2. Pacientes que pudieran tener una exposición profesional a alergenos ambientales (jardineros, agricultores, ganaderos, cuidadores de animales, etc.)
3. Embarazadas y mujeres en periodo de lactancia.
4. Pacientes con sospecha o diagnóstico de intolerancia o alergia alimentária.
5. Sospecha fundada de incumplimiento terapéutico.
6. Pacientes tratados, en los últimos seis meses con corticosteroides sistémicos o en los tres meses anteriores con antihistamínicos sistémicos.
7. Uso eventual de corticosteroides o antihistamínicos, a lo largo del estudio.

#### **5.4. VARIABLES.**

Se detallan en el anexo 3.

Podemos distinguir los siguientes tipos de variables:

- Variable cuantitativa continua: Edad
- Variable cualitativa nominal: Sexo
- Variables cualitativas ordinales: antecedentes personales, antecedentes familiares, consumo de alcohol y tabaco, rinorrea, estornudos, congestión nasal, picor nasal, síntomas oculares de la RA, dificultad respiratoria, crisis de asma, dermatitis atópica, eczemas, manchas pruriginosas.

Las variables que más nos interesan<sup>21</sup>, son rinorrea, estornudos, congestión nasal, picor nasal, síntomas oculares de la RA, ya que son los síntomas básicos de la enfermedad rinitis alérgica.

#### **5.5. SELECCIÓN Y ALEATORIZACION.**

Del estudio de las historias clínicas del centro<sup>22</sup>, preseleccionamos los pacientes que cumplen el criterio de estar diagnosticados de rinitis alérgica, y de disponer de pruebas cutáneas positivas.

Tras consulta personalizada de las historias clínicas, confirmamos nuevamente los datos referentes a los criterios de inclusión y de exclusión y procedemos a enviar a estos pacientes una carta informándole del motivo del estudio y solicitando su cooperación y aceptación a ser incluidos en él (anexo1), además, adjuntamos la primera encuesta clínica, que se tratará de un cuestionario autocumplimentado<sup>23</sup>, con la que vamos a recoger los datos iniciales necesarios para el estudio (anexo2).

Tras un tiempo prudencial, para asegurarnos de la adecuada recepción de las cartas anteriormente citadas, procedemos a concertar una cita personal con los pacientes con el fin de confirmar o descartar su inclusión.

En esa primera cita, cumplimentamos los protocolos referentes a los criterios de inclusión y exclusión, informamos al paciente de los objetivos, la duración del estudio, visitas, ventajas, inconvenientes, voluntariedad y confidencialidad de su participación y solicitamos su consentimiento, por escrito.

Tras la obtención del consentimiento por parte de los pacientes, procedemos a la asignación aleatoria de estos bien sea al grupo control o al grupo de intervención, para ello usaremos una tabla de números aleatorios utilizando el programa de cálculo "Excel 97<sup>®</sup>" de la firma Microsoft<sup>®</sup>, incluido en el paquete ofimático Office 97<sup>®</sup>.

## **5.6. DESARROLLO DEL ESTUDIO**

Tras la primera encuesta, una vez seleccionados los pacientes que pueden ser incluidos en el estudio, y una vez están asignados bien al grupo control o bien al grupo de intervención, se procede a enviar unas cartas indicando a los pacientes las medidas dietéticas que deben de seguir para el desarrollo del estudio, que en nuestro caso, se trata del consumo de leche de vaca o bien la abstinencia en este consumo.

El modelo de carta enviado a los pacientes incluidos en el grupo control se detalla en el anexo 4, mientras que el enviado a los pacientes del grupo de intervención lo podemos ver en el anexo 5.

Posteriormente, se realizarán seis visitas con una periodicidad de dos meses aproximadamente, que nos aportarán datos sobre la evolución de los pacientes, es decir número de crisis, recidivas, seguimiento del tratamiento, seguimiento de los consejos dietéticos, etc.

Estas visitas, se realizarán igualmente mediante unos cuestionarios autocumplimentados<sup>23</sup>, que se enviarán cada dos meses a cada paciente incluido en el estudio. Los cuestionarios, se acompañan de sobre prefranqueado y llamada telefónica, para evitar pérdidas de seguimientos.

Estas encuestas de seguimiento, contienen únicamente preguntas "cerradas", y el paciente únicamente deberá señalar si alguno de los síntomas que ya sufría ha aparecido en ese determinado seguimiento.

El modelo de la encuesta clínica de estas visitas, se detalla en el anexo 6.



## 5.7. REGISTRO Y TRATAMIENTO DE DATOS.

Una fase previa al análisis es la revisión de la matriz de los datos, ya que si contiene datos incorrectos, puede conducir a conclusiones equivocadas.

Por otra parte, también es conveniente realizar un control de calidad de los registros de datos, verificando, que los cuestionarios están adecuadamente cumplimentados, que tienen toda la información requerida, que no nos falta ninguna visita en ningún paciente, desconfiar de datos excesivamente llamativos, comprobar que los pacientes no responden a casillas del cuestionario que no deberían responder.

Este trabajo, deber hacerse en cada visita y es conveniente que sea realizado tanto por el propio investigador como por otra persona colaboradora que revise estos registros con el fin de detectar posibles errores<sup>24</sup>.

## 5.8. ANALISIS ESTADISTICO.

Se realizará teniendo en cuenta los siguientes puntos:

1. Tipo:
  - a. Estadística descriptiva de las variables:
    - i. Para los datos cuantitativos tendremos que calcular su media, mediana, desviación estándar, el intervalo de confianza 95% de la diferencia, los rangos y percentiles
    - ii. Para los datos cualitativos, tendremos que calcular su valor absoluto, el porcentaje y el intervalo de confianza al 95% de la diferencia.
  - b. Estadística inferencial:
    - i. Para los datos de tipo cuantitativo, la comparación de medias y el t test o t de Student
    - ii. Para los datos de tipo cualitativo la prueba de la  $\chi^2$  También tenemos que tener en cuenta que si no disponemos de condiciones de normalidad tendríamos que usar pruebas no paramétricas<sup>25</sup>.
2. Frecuencia:
  - a. Visita 0: Comparabilidad Inicial (estadística descriptiva, estadística inferencial)
  - b. Visitas 1 a 6: Análisis intermedios (estadística descriptiva)
  - c. Comparación visita 0 y visita 6: estadística inferencial
3. Análisis de Resultados:
  - a. Análisis por "intención de tratar": en toda investigación clínica, existe la posibilidad de que aparezcan "pérdidas", ya que si por ejemplo los pacientes que

abandonaron el estudio fueron por ejemplo los del grupo control y además no hubieran sufrido episodios de RA, esto nos conduciría a sobrestimar la eficacia de la intervención, por lo tanto, es conveniente realizar un análisis por "intención de tratar", donde todos los pacientes analizan en los grupos a los que fueron asignados al inicio, sin tener en cuenta si recibieron o no la intervención<sup>26</sup>.

- b. Análisis por protocolo: en los pacientes que finalicen el estudio.

<b>Tabla 1: Análisis Estadístico</b>		
ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	Encuesta Inicial: Comparabilidad inicial de los grupos	
	Visitas 1, 2, 3, 4, 5, 6	
ESTADÍSTICA INFERENCIAL	Encuesta Inicial: Comparabilidad inicial de los grupos	
	Seguimiento 6:	Contraste de Hipótesis
		Análisis por intención de tratar
		Análisis por protocolo

Consideraremos significación estadística, cuando obtengamos una probabilidad de error aleatorio  $p < 0,05$

Consideraremos relevancia clínica si las diferencias entre grupo control y grupo de intervención tengan significación estadística y superen un 20%.

De esta forma, el calculo de p y el intervalo de confianza al 95% de la diferencia de proporciones, nos aportarán información sobre la "eficacia" de la intervención, mientras que el NNT, nos indicará la efectividad y la relevancia clínica del estudio.

Por último, señalar que el análisis de los resultados será llevado a cabo mediante la hoja de cálculo Excel 97<sup>®</sup> (paquete ofimático Office 97<sup>®</sup> de Microsoft Corporation<sup>®</sup>) y el paquete estadístico SPSS-10.0 (Addlink Software Científico<sup>®</sup>)

### 5.9. VALORACION Y CONTROL DE SESGOS

Primeramente, tenemos que hablar del error aleatorio, que como en todos los estudios, nace del hecho de que estamos trabajando sobre unas muestras limitadas de población y no sobre toda la población. Lo controlaremos, diseñando el estudio con un tamaño muestral "suficiente" <sup>18,21</sup>.

Por otra parte, tenemos los llamados "errores sistemáticos" que se producen cuando la medición de alguna de las variables en estudio es considerablemente desigual entre los distintos grupos. Para controlarlo es preciso planificar bien el estudio, elegir adecuadamente su diseño, el tamaño de la muestra o la estrategia de análisis<sup>24</sup>.

Por otra parte, también debemos de valorar y de controlar una serie de sesgos, los más importantes son:

- Sesgos selección, para evaluarlo tenemos que hacernos la siguiente pregunta: ¿todos los participantes tienen la misma probabilidad de recibir la intervención?. Este sesgo podemos prevenirlo con la asignación al azar<sup>27</sup>
- Sesgo de selección que pudiera limitar la comparabilidad final del estudio, para evaluarlo, nos haremos la siguiente pregunta: ¿los individuos que se "pierden" tienen la misma probabilidad de desarrollar los síntomas de la RA que los individuos que terminan el estudio?: hay que estudiar una muestra de los que se "pierden" para poder contestar a la pregunta y poder interpretar los resultados, o bien aceptar que la diferencia entre grupo control y el grupo de intervención sea superior al 20%<sup>26</sup>.
- Sesgo de información, lo evaluamos realizando la siguiente pregunta: ¿los criterios de evaluación se han hecho con las mismas pruebas, los mismos test y la misma frecuencia en todos los individuos estudio?. Esta controlado, ya que es un estudio abierto<sup>27</sup>.
- Sesgo de información, se evalúa con la siguiente pregunta: ¿los criterios de evaluación de las respuestas realizadas por los pacientes a las encuestas clínicas, se pueden considerar suficientemente sensibles y específicas?. Lo controlamos aplicando las mismas encuestas clínicas por igual a los dos grupos estudiados

Teniendo en cuenta los puntos anteriores, podemos afirmar, que los sesgos sistemáticos en este estudio, probablemente están controlados.

Una precisión al respecto, es que dado el tipo de intervención (consejo dietético), no es posible trabajar en condiciones de ensayo clínico "cerrado", al menos en cuanto al investigador. Para controlar, en lo posible, el efecto del investigador en el análisis estadístico de los datos, dicho análisis se realizó "ciego" por la unidad de epidemiología clínica del Departamento de Medicina de la Universidad Miguel Hernández.

Otro aspecto que tenemos que tener en cuenta, es que, los propios pacientes, serán influidos, incluso en sus respuestas clínicas, ya que tanto los pertenecientes al grupo de intervención, como los incluidos en el grupo control, son conscientes de estar estudiados, lo que influirá en su conducta, produciendo un sesgo de "sentirse Observado" o "efecto Hawthorne" <sup>26</sup>. Pensamos que la asignación aleatoria y la comparabilidad inicial de los grupos neutralizan este efecto.

Finalmente, tenemos que hacer mención a los posibles factores de confusión. En principio, la naturaleza del estudio, deja pocas opciones de confusión, no obstante, dos aspectos como son la presencia de pacientes que conviven con animales dado que esta suele ser una fuente de alérgenos y el consumo de medicaciones no relacionadas con la enfermedad alérgica, podrían implicar una cierta confusión de resultados, no obstante, el número de pacientes que tienen estas condiciones, es muy pequeño y además es similar, tanto en el grupo control, como en el grupo de intervención, de forma que consideramos que no deber influir de forma decisiva en la investigación.

## **5. 10. CONSENTIMIENTO – CONSIDERACIONES ETICAS**

En relación a las consideraciones éticas<sup>28,29,30,31</sup>, hay que tener en cuenta los siguientes puntos:

- La contestación, por parte del paciente de la primera carta de información que adjuntaba la primera encuesta clínica (Anexos 1 y 2), supone un consentimiento informado del paciente para ser incluido en el estudio clínico.
- En todo momento, se garantiza una absoluta confidencialidad, ya que desde el principio del estudio, los pacientes sólo van a ser identificados por las iniciales de su nombre y su fecha de nacimiento, así como el "nº de registro".
- Como ya se ha expuesto, la seguridad clínica del paciente estará en todo momento asegurada, ya que cualquier paciente que sufra un proceso relacionado con su enfermedad u otra enfermedad, que pudiera representar un peligro para su salud, será retirado del estudio.

En cuanto a la intervención realizada en el estudio, es decir evitar el consumo de leche en el grupo de intervención, no existe ningún riesgo, dado el plazo de la realización de la investigación, sobre todo teniendo en cuenta los criterios de exclusión, ya descritos.

## **5.11. BÚSQUEDA BIBLIOGRAFICA**

Se han utilizado los siguientes sistemas de búsqueda para conseguir el material bibliográfico:

1. Bases de datos consultadas:
  - Base de Datos MEDLINE .MeSH Database
  - Base de Datos Teseo
  - Base de Datos Cochrane de Revisiones Sistemáticas
2. Criterios y estrategias de búsqueda

- Palabras claves: Rinitis alérgica, leche de vaca, hipersensibilidad, Rhinitis Allergic, Cow` Milk, Hypersensitivity.
  - Límites: 10 años, sólo ítems con resúmenes, idioma inglés, estudios controlados en humanos.
  - Estrategia de búsqueda para Rhinitis Allergic, asociando clasification, diagnosis, diet therapy, economics, epidemiology, etiology, genetics, immunology, physiopathology.
3. Resultados obtenidos
- MeSH Database:
    - a. Búsqueda sin límites: 2867 documentos.
    - b. Búsqueda sin límites: 187 documentos.
  - Base de datos Teseo:
    - a. Motor de búsqueda: "Rinitis Alérgica": 21 tesis doctorales.
    - b. Motor de búsqueda: "Leche de vaca": 58 tesis doctorales.
    - c. Motor de búsqueda: "Hipersensibilidad": 160 tesis doctorales.
  - Base de datos Cochrane:
    - a. Para la búsqueda utilizando "Rinitis Alérgica": 57 documentos encontrados:
      - i. Base de Datos Cochrane de Revisiones Sistemáticas: 25 documentos.
      - ii. Registro de Ensayos Clínicos Iberoamericanos: 1 documento.
    - b. Para la búsqueda utilizando "Rhinitis Allergic": 518 documentos.
    - c. Para la búsqueda utilizando "Leche de Vaca": 14 documentos.
    - d. Para la búsqueda utilizando "Hipersensibilidad": 104 documentos encontrados.
    - e. Para la búsqueda utilizando "Hypersensitivity": 2932 documentos encontrados, 107 documentos revisados.
    - f. Registro de Ensayos Clínicos Iberoamericanos: 4 documento revisados.

El total de documentos encontrados, fue de 6948, tras ser sometidos a los límites ya descritos, fueron considerados pertinentes para nuestro estudio 477 documentos y fueron considerados relevantes 168 documentos.

## **6. RESULTADOS**

Se preseleccionaron 150 pacientes, aceptaron a ser incluidos en el estudio 76 y fueron excluidos por no cumplir los criterios de inclusión / exclusión, 6 pacientes. Por lo tanto, el estudio fue realizado sobre un total de 70 pacientes, 35 pertenecientes al Grupo Control y 35 al Grupo de Intervención.

Tras análisis estadístico de todas las variables incluidas en la encuesta inicial, al comienzo del estudio, no aparece ninguna variable, donde exista diferencia estadísticamente significativa entre el GC y el GI, por lo tanto se comprueba que los grupos son comparables (tablas 2 y 3).

Se “perdieron” el 8,57% de los pacientes incluidos en el GC y el 11,42% de los pacientes del GI lo que da una  $p < 0,05$  (no hay diferencia significativa) (tabla 4).

El análisis de los resultados finales, por enfermedades (Análisis por intención de tratar), nos da los siguientes resultados (tabla 5):

- Rinitis Atópica: Encontramos diferencia significativa ( $p = < 0,001 \rightarrow$  Hay diferencia significativa)
- Asma: No encontramos diferencia significativa ( $p = 0 \rightarrow$  No hay diferencia significativa)
- Dermatitis Atópica: Encontramos diferencia significativa ( $p = < 0,01 \rightarrow$  encontramos diferencia significativa)

En cuanto a los indicadores de relevancia clínica, asumiendo “las peores condiciones”, fueron los siguientes (tabla 6):

- Rinitis Alérgica: RRA: 0,43, RRR: 0,75, NNT: 2,33
- Asma: no hay diferencia significativa, por lo tanto los resultados, no son relevantes.
- Dermatitis Atópica: RRA: 0,16, RRR: 0,29, NNT: 17,49

<b>Tabla 2 : Datos de pacientes extraídos de la encuesta inicial (datos generales)</b>				
	<b>GC (n= 35)</b>	<b>GI(n=35)</b>	<b>IC</b>	<b>P</b>
<b>SEXO:</b>				
<b>Varones</b>	13 varones (37,14%)	12 varones 35,28%	+/-0,12	0,80 NS
<b>Mujeres</b>	22 mujeres 62,85%	23 mujeres 65,71%		
<b>EDAD (años)</b>	Media: 32,82 Mediana:30 Desviación estandar: 13,49 Max: 75 años Min: 11 años	Media: 34,80 Mediana: 35 Desviación estandar: 15,21 Max: 65 años Min: 11 años	8,83 / - 4.88	0,4 NS
<b>ANTECEDENTES FAMILIARES</b>	10 (24,3%)	12 (28,6%)	-0,04+/- 0,12	0,9 NS
<b>ANTECEDENTES PERSONALES</b>	7 (20%)	7 (20%)	0 +/- 0,1	0,9 NS

Tabla 3: datos de pacientes en encuesta inicial: Enfermedades atópicas				
	GC (n=35)	GI (n=35)	IC 95%	P
<b>RINITIS ALERGICA</b>	35 (100%)	35 (100%)	0	0 NS
<b>ASMA</b>	14 (40%)	9 (25,7%)	0,14 +/- 0,21	0,5 NS
<b>DERMATITIS ATÓPICA</b>	10 (28,57%)	8 (22,85%)	0,06 +/- 0,21	0,75 NS

GC: grupo control, GI: grupo de intervención, IC: intervalo de confianza de la diferencia al 95%,  
S: significativo, NS: no significativo

Tabla 4: Cumplimiento de estudio desde la visita 1 a la visita 6				
	GLOBAL (n=70)	GC (n=35)	GI (n=35)	p
CUMPLIDORES VISITA 1	70 (100%)	35 (100%)	35 (100%)	NS
CUMPLIDORES VISITA 2	70 (100%)	35 (100%)	35 (100%)	NS
CUMPLIDORES VISITA 3	70 (100%)	35 (100%)	35 (100%)	NS
CUMPLIDORES VISITA 4	66 (94,28%)	33 (94,28%)	33 (94,28%)	NS
CUMPLIDORES VISITA 5	65 (92,85%)	33 (94,28%)	32 (91,42%)	NS
CUMPLIDORES VISITA 6	63 (90,00%)	32 (91,42%)	31 (88,57%)	NS

GC: grupo control; GI: grupo de intervención; resultados expresados en número absoluto (en porcentaje entre paréntesis); p calculada con t de Student;  
NS: No significativo

Tabla 5: tabla relacionando las enfermedades atópicas en la encuesta inicial y la sexta visita								
Enfermedad	ENCUESTA INICIAL				VISITA N° 6			
	GC (n=35)	GI (n=35)	I.C. 95%	P	GC (n=35)	GI (n=35)	I.C. 95%	p
<b>Rinitis Alérgica</b>	35 (100%)	35 (100%)	-----	0 NS	20 (57,14%)	1 (2,85%)	0,54+/-0,17	>0,001 S
<b>Asma</b>	14 (40%)	9 (25,71%)	0,14+/- 0,22	0,5NS	0 (0%)	0 (0%)	---	0 NS
<b>Dermatitis Atópica</b>	10 (28,57%)	8 (22,85%)	0,06+/- 0,20	0,7NS	7 (20%)	1 (2,85%)	0,26+/-0,16	0,01 S

GC: grupo control; GI: grupo de intervención; resultados expresados en número absoluto (en porcentaje entre paréntesis); I.C. Intervalo de Confianza de la diferencia al 95%; S: significativo; NS: No significativo

**Tabla 5. Indicadores de relevancia clínica, por "intención de tratar" asumiendo las peores condiciones (enfermedades atópicas)**

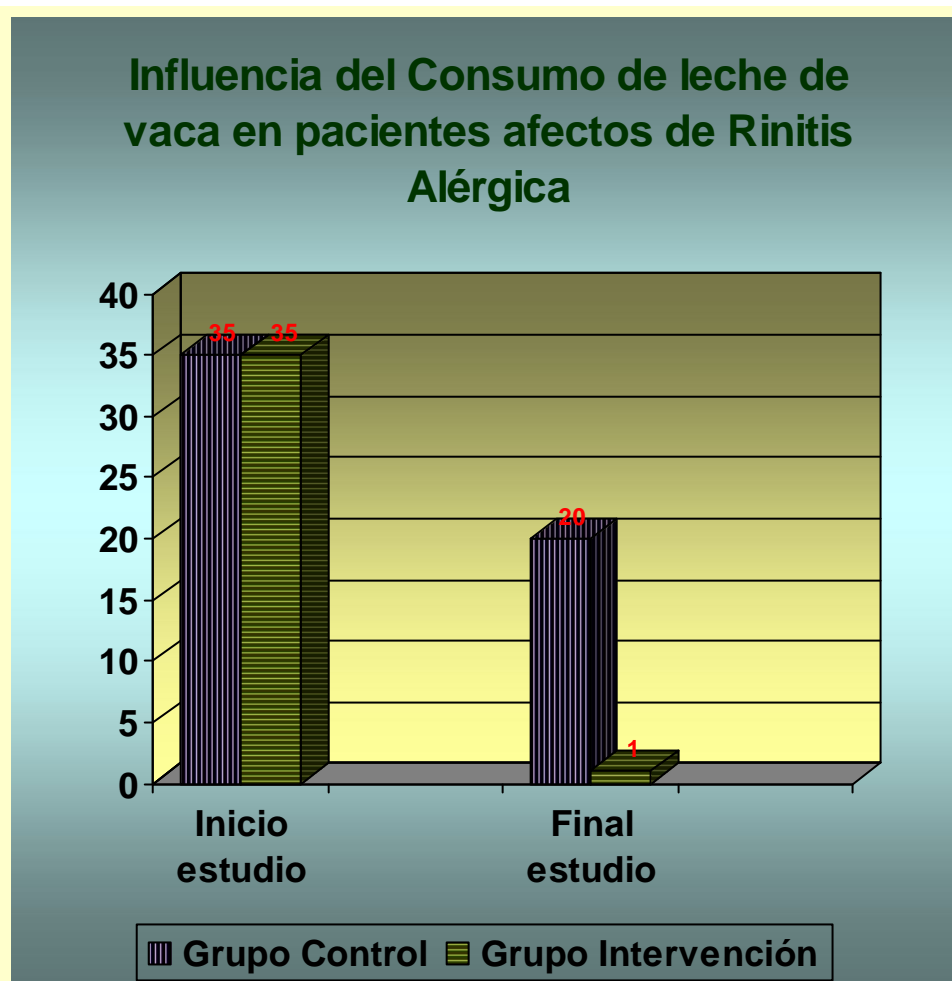
	GC (n=35) (PER=3)	GI (n=35) PER=4	IC 95%	RRA	RRR	NNT
<b>Rinitis Alérgica</b>	20(57,14%)	5(14,2%)	0,43 +/- 0,20	0,43	0,75	2,33
<b>Asma</b>	0 (0%)	4 (11,4%)	- 0,11 +/- 0,05	- 0,12	-0,9	-7,77
<b>Dermatitis Atópica</b>	7(20%)	5(14,2%)	0,06+/- 0,17	0,16	0,29	17,49

GC: casos grupo control, GI: casos grupo intervención, PER: pérdidas

RAR: reducción absoluta del riesgo, RRR: reducción relativa del riesgo,

NNT: número de pacientes necesarios para tratar.

Los resultados finales pueden observarse gráficamente en la siguiente figura





## **7. DISCUSION**

Como se señaló en la introducción, la Rinitis Alérgica, es una enfermedad de extraordinaria frecuencia en la práctica clínica<sup>2</sup>.

Además, su etiología es multifactorial, interviniendo factores muy diversos, entre los más importantes, están los genéticos, inmunológicos y ambientales<sup>4</sup>.

Entre los factores ambientales, en este estudio, centramos nuestra atención, en los factores nutricionales y más específicamente en el consumo de leche de vaca, en la dieta de pacientes previamente diagnosticados de Rinitis Alérgica.

Afortunadamente, contamos con un número muy importante de estudios trabajos, publicaciones, libros, etc., centrados en la RA, lo que nos facilitó enormemente la comprensión de la enfermedad<sup>32,33,34</sup>, empezando por el estudio de las reacciones de hipersensibilidad<sup>35,36</sup>, y continuando para la RA propiamente dicha.

Por otra parte, el número de estudios que asocian la intolerancia a la lactosa con las enfermedades alérgicas<sup>37,38,39</sup>, puede contarse por cientos o incluso miles, existiendo revisiones recientes de sumo interés, sobretodo en el campo de las enfermedades alérgicas de los niños<sup>40,41,42</sup>.

Aparecen, últimamente en el campo de la investigación de la prevención de las alergias en relación con alimentación, varios artículos sobre el interés de utilizar lácteos fermentados en el curso del tratamiento de la RA<sup>44</sup>, y algunos estudios que orientan a la supresión de proteínas de la leche de vaca como factor preventivo secundario en enfermedades alérgicas, sobretodo en lactantes<sup>45,46</sup>.

Lo que no aparece, de forma explícita, son estudios que relacionen directamente las enfermedades alérgicas y el consumo de leche de vaca en pacientes que no presenten ni alergia a las proteínas de leche de vaca, ni galactosemia, ni alergia a la lactosa, es decir que no presenten ningún tipo de intolerancia a la leche de vaca como alimento.

Éste fue motivo, de pensar que era conveniente realizar un estudio clínico de estas características.

### **7.1 DISCUSION DE LOS OBJETIVOS**

El objetivo de esta investigación era comprobar si el consumo de leche de vaca, en la dieta de pacientes afectados de rinitis alérgica, pudiera tener alguna influencia en la aparición o desarrollo de la enfermedad.

Primeramente, teníamos que precisar, que no estábamos hablando de los cuadros comprobados de intolerancia a la lactosa, o los cuadros de intolerancia a las proteínas de la leche de vaca, por ello, era importante para el curso de esta investigación dejar claro que la influencia de la leche de

vaca, tenía que ser estudiada en pacientes en los cuales estamos seguros no existía ninguna de las citadas intolerancias.

Por lo tanto, el objetivo específico<sup>16,45</sup> o primario de éste estudio, tenía que ser encontrar, o no encontrar, una relación entre el consumo de leche de vaca y la aparición de episodios de RA en pacientes previamente diagnosticados mediante pruebas inmunológicas, siendo el factor de estudio, el consumo de leche de vaca, el criterio de evaluación, la aparición de episodios de RA y la población de estudio, los pacientes afectados de RA<sup>16,47</sup>.

En cuanto al objetivo secundario, tenía que ser encontrar o no encontrar, una relación entre el consumo de leche de vaca y la recidiva de los síntomas, más frecuentes de la rinitis alérgica.

Por último, como valoraron síntomas de otras enfermedades alérgicas, como son el Asma y la Dermatitis Atópica, nos propusimos un objetivo terciario, donde trataríamos de encontrar una relación entre el consumo de leche de vaca y la aparición concomitante de síntomas de Dermatitis Atópica y el Asma Reagínico.

## **7.2. DISCUSION DEL DISEÑO DEL ESTUDIO Y DE LA HIPOTESIS DE TRABAJO**

El objetivo de los estudios experimentales biomédicos, es evaluar la eficacia de cualquier intervención preventiva, curativa o rehabilitadora.

Estos estudios, se definen por dos características<sup>17,48</sup>:

- a) Control por parte del investigador del factor de estudio, en este caso, el consumo de leche de vaca.
- b) Asignación de los pacientes a los distintos grupos de estudio de forma aleatoria.

Por lo tanto, si los grupos obtenidos eran comparables, podremos afirmar que los posibles resultados obtenidos pueden deberse a la intervención con un alto grado de convicción.

De entre los distintos estudios experimentales, escogimos el ensayo clínico aleatorio, por una parte, por ser el tipo de estudio experimental que permite controlar mejor los sesgos y por tanto la fiabilidad de los resultados<sup>17</sup>.

A pesar de las limitaciones de la estadística, el término "estadísticamente significativo"<sup>49</sup>, se percibe como una etiqueta que indicase "garantía de calidad".

Los test de contraste de hipótesis son test de significación estadística que cuantifican hasta que punto la variabilidad de la muestra puede ser responsable de los resultados de un estudio en particular.

La  $H_0$  (hipótesis nula) representa la afirmación de que no hay asociación entre las dos variables estudiadas y la  $H_a$  (hipótesis alternativa) afirma que hay algún grado de relación o asociación entre las dos variables<sup>50,51,52</sup>.

Basándonos en el concepto anterior, elegimos llamar hipótesis nula  $H_0$ , aquella según la cual, tras la valoración estadística de los resultados, quedaba demostrado, que no había diferencia significativa entre el grupo de pacientes afectados de Rinitis Alérgica, que sin ser sometidos a un tratamiento específico, consumieron leche de vaca, es decir el llamado "Grupo Control" y aquellos pacientes que igualmente sin ser sometidos a un tratamiento específico, se les privó del consumo de leche de vaca es decir el llamado "Grupo de Intervención".

Por lo tanto, existe la llamada hipótesis alternativa  $H_a$ , en la cual sí que existe diferencia significativa entre ambos grupos.

### **7.3. DISCUSION DE LOS PACIENTES Y METODOS**

En relación a la metodología, tenemos que tener en cuenta los siguientes puntos:

#### **I. DISCUSION DEL AMBITO DE ESTUDIO**

Los pacientes que podrían ser sometidos al estudio, fueron extraídos del archivo de historias clínicas propiedad del investigador y realizadas en una consulta de medicina naturista y homeopatía situada en la ciudad de Alicante – España.

Este ámbito de estudio, fue seleccionado para facilitar la obtención de posibles pacientes dispuestos a ser incluidos en el estudio y además por ser accesibles al investigador.

#### **II. DISCUSION DEL TAMAÑO MUESTRAL**

Para el cálculo del tamaño muestral necesario para la realización de este ensayo clínico, tuvimos en cuenta varias estrategias<sup>18</sup>:

- Las respuestas que esperábamos, en principio, según los datos epidemiológicos de la RA, tenían que ser frecuentes, lo que nos permitiría ajustar el tamaño muestral.
- Los criterios de inclusión y exclusión, determinaban una población homogénea, en el que la variabilidad de las características, pueda influir menos en los resultados finales.
- En el diseño del estudio utilizamos una asignación aleatoria a los grupos de estudio, lo que disminuye la variabilidad
- Diseñar un estudio con siete seguimientos (encuesta inicial y seis visitas), a lo largo de un año, lo que equivale a realizar medidas repetidas de un evento.

A partir de estos conceptos decidimos utilizar las tablas para el cálculo del número de sujetos necesario en cada grupo de estudio para la comparación de dos proporciones, tal y como se ha expresado anteriormente en este estudio.

### **III. DISCUSION DE LOS CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION**

En toda investigación clínica, la población diana que va a participar en el estudio, tiene que ser sometida a unos criterios de exclusión e inclusión que aseguren, por una parte una objetividad del estudio, pero que por otra parte tengan en cuenta que nuestro trabajo se centre, lo mas posible, sobre un segmento de la población lo más general posible, para que los resultados puedan aplicarse lo mas "universalmente" posible<sup>53</sup>.

Evidentemente, el seleccionar una población homogénea (población diana, es decir susceptible de ser sometida al estudio), va a traer como consecuencia una disminución de la representatividad de los resultados a nivel de la población en general<sup>53</sup>.

Por otra parte, a los sujetos elegidos, se les aplicaron los criterios de inclusión y exclusión, antes de realizar el estudio, lo que trajo como consecuencia, que tanto la inclusión como la exclusión de determinados pacientes, no iba a suponer un sesgo en la comparación de los dos grupos estudio, es decir no afecta a la validez interna de los resultados<sup>22,44</sup>.

Como era de esperar, en los criterios de inclusión, el argumento principal fue que los pacientes estuvieran diagnosticados de rinitis alérgica según unos parámetros internacionalmente reconocidos<sup>20</sup>.

En relación al diagnostico previo de RA, exigimos que en todos los casos existieran pruebas cutáneas positivas a alguno de los alérgenos más frecuentes en la provincia de Alicante.

Es decir, no podíamos conformarnos con disponer únicamente de síntomas relevantes de rinitis alérgica, por lo tanto lo mejor era escoger unas pruebas objetivas, y sin duda, las que más valor nos podían aportar, eran las pruebas epicutáneas o intradérmicas a los aeroalérgenos mas frecuentes del hábitat del enfermo, ya que son hasta el momento las pruebas "in vivo" mas sensibles en la práctica clínica para el diagnostico de la rinitis alérgica<sup>55</sup>.

Otro criterio de inclusión importante, fue que todos los pacientes, tenían que consumir antes del estudio, leche de vaca, en su dieta habitual, ya que si alguno de los pacientes tuviera una cierta aversión a este alimento, podría producir errores en los resultados, de muy difícil cuantificación.

En cuanto a los criterios de exclusión sus fundamentos fueron los siguientes:

- Evitamos incluir pacientes de más de 75 años de edad, ya que en general, en éstos periodos de la vida, suelen presentarse, a menudo patologías múltiples, que entrarían en contradicción con el punto anterior.

- Evitamos incluir niños menores de siete años de edad, ya que en el caso de ser asignados al grupo de intervención, habría que retirar la leche de vaca de su dieta habitual, y dado que están en crecimiento, tal vez no fuera muy ético, sin pruebas científicas concluyentes, evitar el consumo de este alimento a niños tan pequeños. Este razonamiento, también podría haber sido usado en niños de más de siete años, pero como la rinitis alérgica aparece muy frecuentemente en la infancia, creímos que era importante incluir niños en el estudio y decidimos que a partir de los siete años estar un tiempo sin tomar leche de vaca no sería un déficit nutricional de extrema importancia.
- También evitamos incluir en éste estudio pacientes que por su profesión tuvieran un excesivo contacto con posibles alérgenos, como por ejemplo jardineros, panaderos, agricultores, ganaderos, cuidadores de animales, ya que esta presunta excesiva exposición a alérgenos podría influir en el desarrollo de los síntomas de rinitis alérgica introduciendo un sesgo muy difícil de valorar en el estudio.
- En cuanto a la exclusión de mujeres embarazadas o bien en período de lactancia, es razonable, ya que en estos períodos, las necesidades de los nutrientes derivados de la leche de vaca son muy importantes tanto para la mujer embarazada, como para la mujer lactante.
- Evitamos incluir en el estudio pacientes que sufrieran una intolerancia alimentaria demostrada, tanto a la lactosa, a las proteínas de leche de vaca como a otros alérgenos alimentarios conocidos, como el pescado, el huevo, etc. La razón de estas exclusiones, es evitar un sesgo de comparación, ya que probablemente, sería difícil que existiera un número similar de pacientes intolerantes a un determinado alimento, en ambos grupos de estudio.
- Evitamos incluir en el estudio, pacientes, que por la experiencia, que nos daban sus historias clínicas, nos hicieran dudar del adecuado cumplimiento, por parte del paciente, de las recomendaciones clínicas y terapéuticas, que se le prescribieran.
- Por la posible interferencia sobre el desarrollo de la RA, preferimos excluir a todos aquellos pacientes que hubieran sido tratados en los seis últimos meses con corticosteroides o tres meses anteriores, con antihistámicos, estimando que este periodo sería suficiente para asegurar que el efecto de posibles tratamientos, no va a influir en la aparición de episodios de RA.

#### **IV. DISCUSION DE LA SELECCION Y ALEATORIZACION**

Los pacientes que integraron la población estudiada se seleccionaron entre pacientes que habían acudido en los meses anteriores, a una consulta privada de Medicina Naturista y Homeopatía.

La primera pregunta que podríamos hacernos, es, si al ser pacientes seleccionados dentro de la propia consulta, ¿podría deducirse que los resultados no pudieran generalizarse adecuadamente?<sup>54,56,57</sup>. En realidad, creímos, que la selección fue realizada sobre una “muestra” de la población general, ya que al ser pacientes de procedencia, profesiones, edades, etc. muy heterogénea, y teniendo en cuenta que los pacientes que acuden a una consulta de medicina naturista no provienen de ningún grupo social específico, se puede considerar que los pacientes seleccionados, son una “muestra” de la sociedad en general.

En cuanto al método de selección de sujetos, consideramos que es suficientemente objetivo, por los siguientes motivos:

- a) Por una parte, todos los pacientes debían aportar pruebas diagnósticas de RA objetivas, como las pruebas epicutáneas
- b) La recogida de datos clínicos, se realiza mediante un cuestionario común para todos los pacientes (Anexo 2)
- c) Se comprueban los datos obtenidos en esta primera encuesta clínica (Anexo 2) mediante entrevistas clínicas personalizadas.

Es importante señalar que de los primeros 150 pacientes preseleccionados, sólo contestan aceptando entrar en el estudio, 76 pacientes, es decir sólo un 50,6%, o lo que es lo mismo un 49,4% de los pacientes preseleccionados, no mostró interés en participar en un estudio.

Si en general es difícil encontrar pacientes que deseen formar parte de un ensayo clínico, la dificultad, se ve aumentada, por dos razones:

- a) Por una parte, a los pacientes se les solicitaba no realizar un tratamiento específico de su Rinitis Alérgica
- b) Por otra a los pacientes del Grupo de Intervención se les solicitó cambiaran sus hábitos de alimentación y no consumieran leche de vaca, algo, por lo general de gran dificultad, para cualquier persona, ya que tal y como defendía el profesor Francisco Grande Covián “es más difícil cambiar de alimentación que de religión”<sup>58</sup>.

Una vez seleccionados los pacientes, y disponiendo del pertinente “consentimiento Informado”, era necesario distribuirlos en los dos grupos a estudio, es decir el grupo control y el grupo de intervención, además, como en toda investigación clínica, era importante que los dos grupos comparados en el estudio fueran lo más homogéneos posible.

También, era imprescindible que los sujetos a estudio fueran asignados de forma totalmente aleatoria bien al grupo control o bien al grupo de intervención.

Para ello, lo más sencillo, fue crear una tabla de números aleatorios<sup>59</sup>, utilizando una hoja de cálculo, en particular el programa Excel 97 (Microsoft®).

Por lo tanto, todos los pacientes fueron distribuidos usando un método de distribución aleatoria simple<sup>111</sup>.

## **V. DISCUSION DEL DESARROLLO DEL ESTUDIO**

Como ya se ha señalado anteriormente, de los 150 pacientes preseleccionados sólo contestaron 76 y seis de ellos, no superaron los criterios de inclusión y exclusión fundamentalmente a causa de su edad (mayores de 75 años o menores de siete años de edad), y un paciente por su profesión (específicamente un jardinero).

No obstante, como estos seis pacientes no fueron incluidos en el estudio, no podrían influir ni en el grupo control ni en el grupo de intervención, por lo que no podrían suponer un sesgo de comparación.

Tras la primera encuesta clínica, una vez seleccionados los pacientes que serían integrados en el estudio y una vez realizadas las entrevistas clínicas iniciales y obtenidos los pertinentes "consentimientos informados" el estudio contemplaba la realización de hasta seis visitas, mediante seis cuestionarios "cerrados"<sup>23</sup>, en los que los pacientes sólo tenían que señalar aquellos síntomas relacionados con la rinitis alérgica u otra enfermedad atópica, de las que ya habían declarado previamente en la primera encuesta clínica, es decir sólo tenían que señalar las posibles recidivas sintomáticas que hubieran sufrido desde la anterior encuesta.

Esta duración de un año se consiguió, enviando los cuestionarios de seguimiento con una periodicidad de aproximadamente cada dos meses, como eran seis visitas, el estudio, en su fase de recogida de datos transcurre durante doce meses.

Con esta duración, además de cumplir con los requisitos de los postulados de la medicina basada en la evidencia<sup>19,22</sup>, incluía las posibles variaciones estacionales, importantes en el desarrollo de la rinitis alérgica.

Hay que destacar, que tanto la primera encuesta clínica, como las seis visitas posteriores, se realizan mediante cuestionarios autocumplimentados, que posteriormente, en entrevista personal, en consulta, son revisados, para mejorar un mayor porcentaje de respuestas, clarificar las respuestas, si fuera necesario y mejorar el control sobre las respuestas y sobre la evolución clínica del pacientes<sup>23</sup>.

No obstante, hay que insistir en que en todo momento, las preguntas y por lo tanto las respuestas de los cuestionarios son “cerradas” para facilitar la codificación y la uniformidad de respuestas<sup>23</sup>.

## **VI. DISCUSION DEL REGISTRO Y TRATAMIENTO DE DATOS**

Durante la realización del trabajo de investigación, fue necesario vigilar la calidad de los datos<sup>21</sup>. Su verificación detectaría inexactitudes, errores u omisiones, así como datos incorrectamente recogidos y resultados dudosos o improbables.

Durante el estudio, los cuestionarios debían de ser revisados periódicamente para comprobar que contenían todos los datos.

Así se pudo, detectar errores en las contestaciones a algún cuestionario, lo que nos permitió realizar esas preguntas en las entrevistas clínicas, evitando la pérdida de información.

Por otra parte, también era interesante, disponer de personas, que aunque ajenas a la investigación, pudieran revisar los cuestionarios, comprobando que estos se habían rellenado correctamente.

## **VII. DISCUSION DEL ANALISIS ESTADISTICO**

Los conceptos estadísticos deben considerarse como una parte integrante del método científico.

La aplicación del razonamiento estadístico comienza en la fase de planificación y debe continuar a lo largo de todo el estudio.

Su adecuada utilización permitió evaluar y cuantificar la variabilidad debida al azar, y poder reducirla, de forma que el estudio pudiera tener las máximas garantías de alcanzar el objetivo deseado.

Clásicamente, la estadística se diferencia en descriptiva e inferencial<sup>60</sup>, y últimamente siguiendo los conceptos de la medicina basada la evidencia se añade el análisis por “intención de tratar”.

La estadística descriptiva comprende la organización, presentación y síntesis de la información y fue fundamental en la revisión de los datos recogidos en el estudio, para asegurar su calidad y la validez del análisis a que fueron sometidos.

La estadística inferencial, nos permitió establecer conclusiones relacionadas con las poblaciones estudiadas a partir de los resultados obtenidos, basándonos en la teoría probabilística<sup>25</sup>.

En cuanto al análisis por “intención de tratar, fue útil para no introducir errores debidos a las “pérdidas”, ya que aquí todos los pacientes se analizaron en los grupos a los que fueron asignados al inicio, sin tener en cuenta si recibieron o no la intervención.



## VIII. DISCUSION DE LA VALORACION Y CONTROL DE SESGOS

En toda investigación clínica, siempre existe una posibilidad de que se nos introduzca un cierto sesgo que hay que intentar prever en el diseño del estudio y valorar su posible magnitud al final de la investigación<sup>17,27</sup>.

Los errores y sesgos de debemos tener en cuenta y por lo tanto controlar son:

- Error aleatorio: nace del hecho de que estamos trabajando sobre unas muestras limitadas de población y no sobre toda la población. Fue controlado, diseñando el estudio con un tamaño muestral "suficiente"
- Errores sistemáticos: se producen cuando la medición de alguna de las variables en estudio es considerablemente desigual entre los distintos grupos. Lo controlamos con una buena planificación del estudio.
- Sesgos de selección: puede limitar la comparabilidad final del estudio. Para su control, teníamos que asegurarnos que los individuos que se "pierden" tienen la misma probabilidad de desarrollar los síntomas de Rinitis Alérgica que los individuos que terminan el estudio.
- Sesgos de información: Los criterios de evaluación tenían que hacerse con las mismas pruebas, los mismos test y la misma frecuencia en todos los individuos estudio, además las respuestas realizadas por los pacientes a las encuestas clínicas, tenían que ser suficientemente sensibles y específicas. Lo controlamos mediante técnicas de "ciego" y aplicando las mismas encuestas clínicas por igual a los dos grupos estudiados.
- Efecto del investigador sobre el análisis de los datos: dado que no podía ser un ensayo clínico "cerrado", para controlar este efecto, debimos encargar el análisis de los datos a personal externo al estudio, en particular, la unidad de epidemiología clínica del Departamento de Medicina de la Universidad Miguel Hernández
- Efecto Hawthorne: el sólo hecho de que un paciente sepa que esta incluido en un estudio, posibilita este efecto. La asignación aleatoria y la comparabilidad inicial de los grupos neutralizan este efecto.

Con estas precisiones, podemos afirmar que este estudio tiene suficiente fiabilidad.

## IX. DISCUSION DEL CONSENTIMIENTO – CONSIDERACIONES ETICAS

Un ensayo clínico, es en esencia, una investigación experimental aplicada a seres humanos, por lo que es necesario tener en cuenta una serie de aspectos éticos de suma importancia, ya que no

siempre, es fácil justificar una intervención hecha sobre personas, sobre todo cuando este ensayo clínico, no había sido realizado anteriormente.

Además de las exigencias legales<sup>28,29,30,31</sup>, nos propusimos una serie de restricciones éticas<sup>17,61,62</sup>, que fueron:

- Los factores a estudio debían limitarse a los aspectos potencialmente preventivos de una enfermedad o sus consecuencias. El presente estudio cumplía, sin problemas, este aspecto, ya que buscábamos conocer la influencia del consumo de leche de vaca en enfermos de rinitis alérgica, con una finalidad principalmente preventiva.
- Las exposiciones en todos los grupos de estudio debían ser igualmente aceptables según los conocimientos actuales. En este estudio, no se sometió a ningún paciente a ninguna exposición, en especial, ya que únicamente se trataba de evitar el consumo de leche de vaca de forma temporal, en el caso del grupo de intervención, mientras que en el grupo control no hay ninguna acción externa ni ninguna supresión dietética, por lo tanto también se puede afirmar que este estudio cumple este aspecto ético.
- Los sujetos incluidos en un estudio clínico no debían de ser privados en ningún momento de las mejores medidas terapéuticas y preventivas. Es verdad, que evitamos la aplicación de medidas terapéuticas, pero siempre teniendo en cuenta que las posibles crisis de rinitis alérgica que pudiera sufrir alguno de los pacientes, no fueran muy intensas, muy duraderas, o muy molestas para el paciente, y por supuesto, en caso surgir alguna patología atópica grave, como por ejemplo una crisis de asma, el paciente en cuestión, tendría que ser tratado de forma adecuada y retirado del estudio.
- Los sujetos debían de ser informados de su participación en un experimento y sus posibles consecuencias. Como ya hemos descrito en el punto 6, a todos los pacientes candidatos a ser incluidos en la investigación, se les envió una carta (Anexo1) explicándoles la finalidad del mismo, informándoles en que consistiría su participación en la investigación, asegurándoles a todos, que toda la información que aportarían, sería tratada con absoluta confidencialidad. La contestación a esta carta, supuso, de hecho, un "consentimiento informado", con todas sus consecuencias.
- Toda la investigación, debía de ser monitorizada constantemente, de forma que de aparecer alguna circunstancia anómala, indeseable o peligrosa para el paciente, esta debía de ser motivo de finalización anticipada del estudio. Afortunadamente en este trabajo, no fue preciso retirar a ningún paciente anticipadamente, ya que salvo alguna crisis asmática, que se resolvió con el uso de salbutamol, no se presentaron problemas importantes para los pacientes.

## 7.4 DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Los resultados de este estudio, se pudieron resumir en los siguientes puntos:

- a) Resultados por síntomas de enfermedades
  - Los síntomas de la rinitis alérgica, presentaron una diferencia significativa (en general creciente) a partir del segundo seguimiento, esta diferencia significativa se mantuvo hasta el sexto seguimiento, con la única excepción del síntoma "picor nasal" que en el sexto seguimiento apareció con diferencia no significativa. Por lo tanto, para los síntomas de la rinitis alérgica pudimos rechazar la hipótesis 0 ( $H_0$ ) y aceptar la hipótesis alternativa ( $H_a$ ).
  - En cuanto a los síntomas más relacionados con la enfermedad asma reagínico, encontramos que no aparece a lo largo de todo el estudio ningún síntoma con diferencia significativa. Por lo tanto para los síntomas del asma tenemos que aceptar la hipótesis 0 ( $H_0$ ) y rechazar hipótesis alternativa ( $H_a$ ).
  - Por último, para los síntomas de la enfermedad dermatitis atópica, encontramos que en general todos sus síntomas no presentan diferencia significativa a lo largo de todo el estudio, únicamente en el caso de crisis de dermatitis atópica, como síntoma, sí presentaba diferencia significativa en las visitas uno y dos, diferencia significativa que desaparece a partir de la visita número 3, hasta el final del estudio, por lo tanto para los síntomas de la dermatitis atópica, tenemos que aceptar la hipótesis 0 ( $H_0$ ) y rechazar la hipótesis alternativa ( $H_a$ ).
- b) Cuando agrupamos los síntomas en enfermedades según los criterios diagnósticos ya descritos señalados anteriormente<sup>20,63,64</sup>, encontramos una tendencia similar a la obtenida en los resultados por síntomas con alguna excepción:
  - En la enfermedad Rinitis Alérgica encontramos una diferencia significativa, a partir de la segunda visita, esta diferencia significativa se mantuvo hasta la sexta visita. Por lo tanto, para la enfermedad "rinitis alérgica" tendríamos que rechazar la hipótesis 0 ( $H_0$ ) y aceptar la hipótesis alternativa ( $H_a$ ).
  - La enfermedad Asma, no presentó diferencia significativa a lo largo de todo el estudio. Por lo tanto para la misma, teníamos que aceptar la hipótesis 0 ( $H_0$ ) y rechazar hipótesis alternativa ( $H_a$ ).
  - En cuanto a la enfermedad Dermatitis Atópica, al agrupar los síntomas nos encontramos con un resultado un tanto diferente al obtenido al analizar los síntomas individualmente, de forma que sí encontramos diferencia estadísticamente

significativa en las visitas 1, 2, 3, 5 y 6 y únicamente en el visita número 4 no apareció diferencia significativa entre los pacientes del grupo control y los pacientes del grupo de intervención. Por lo tanto, como existía diferencia significativa entre la sexta visita y la encuesta inicial, consideramos que para enfermedad dermatitis atópica, teníamos que rechazar la hipótesis 0 ( $H_0$ ) y aceptar la hipótesis alternativa ( $H_a$ ).

- c) Una vez analizados los resultados de la encuesta inicial y de las encuestas de seguimiento, era importante analizar si había diferencia significativa entre los pacientes que habían abandonado el estudio prematuramente o bien habían sido retirados por alguna razón, es decir, habría que analizar el resultado del porcentaje acumulado de cumplidores en cada seguimiento con el fin de ver si los dos grupos estudio se mantenían comparables a lo largo del estudio. Los resultados fueron los siguientes:
1. Accedieron a ser incluidos en el estudio 76 pacientes
  2. Tras ser aplicados los criterios de inclusión y de exclusión, se aceptaron 70 pacientes en el estudio
  3. Se formaron dos grupos con 35 pacientes cada uno
  4. En las tres primeras visitas no hubo pérdidas
  5. En la cuarta visita, se perdieron dos pacientes del GC y dos pacientes del GI. Como se trataba de datos cuantitativos, se aplicó el t-test con el resultado de que no había diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos que continuaron el estudio.
  6. En la quinta visita, se perdió sólo un paciente del GI, y al aplicar el t – test, tampoco apareció diferencia significativa entre ambos grupos, a pesar de las pérdidas.
  7. En la sexta y última visita, se perdieron, un paciente del GC y un paciente del GI. Tras aplicar el t – test no había diferencia significativa entre ambos grupos estudio.
- d) Posteriormente, relacionamos los resultados obtenidos en la encuesta inicial, y los obtenidos en la sexta visita, observándolos únicamente desde un punto de vista descriptivo, ya que no se tienen en cuenta las pérdidas, ya comentadas. Esta relación la expusimos en la tabla N° 5, donde se compararon los resultados por enfermedades en la encuesta inicial y en la visita 6.
- e) Como en todo ensayo clínico, lo que mas nos interesó, era encontrar datos de relevancia clínica. Para calcularlos, no era suficiente calcular la Reducción del Riego Absoluta (RRA), Reducción del Riego Relativa (RRR) o el Número Necesario de pacientes para

Tratar (NNT)<sup>21,22</sup>, contabilizando únicamente los pacientes que habían finalizado el estudio, sino que era importante tener en cuenta igualmente a los pacientes que lo habían abandonado prematuramente. Evidentemente, en esas condiciones, no podíamos conocer que pacientes “perdidos”, podrían sufrir o no sufrir los diversos síntomas o patologías a estudio, y como es lógico, podríamos enfrentarnos al mejor escenario posible, que era que todos los pacientes perdidos del grupo control sufrieran los síntomas o patologías, mientras que todos los pacientes perdidos de grupo de intervención no los sufrieran.

Pero este escenario, evidentemente no es realista, por lo tanto decidimos asumir las peores condiciones posibles, que eran aceptar que ninguno los pacientes perdidos del grupo de intervención sufriera síntomas o patologías, mientras que todos los pacientes perdidos del grupo de intervención, sufrieran todos los síntomas y patologías estudiados.

De las puntualizaciones anteriormente expuestas, podemos extraer las siguientes consideraciones:

1. No existe diferencia significativa en ninguna de las tres enfermedades (rinitis alérgica, asma, dermatitis atópica), en la encuesta inicial, por lo tanto son grupos comparables al inicio del estudio.
2. Al término del estudio, más de un año después y con la única diferencia de retirar el consumo de leche de vaca en la dieta de los pacientes incluidos en el grupo de intervención, hay una diferencia estadísticamente significativa evidente, entre los pacientes del grupo control para la enfermedad rinitis alérgica, incluso asumiendo las peores condiciones
3. Al término del estudio, encontramos diferencia significativa para la enfermedad dermatitis atópica, pero si asumimos las peores condiciones, esta diferencia significativa desaparece.
4. Al término del estudio, no hay diferencia significativa en los pacientes que sufren asma.

Por lo tanto el resultado del estudio, nos indica que para la enfermedad rinitis alérgica podemos rechazar la hipótesis nula ( $H_0$ ) y aceptar la hipótesis alternativa, mientras que para las enfermedades asma y dermatitis atópica, tenemos que aceptar la hipótesis nula ( $H_0$ ).

Si comparamos nuestros resultados con estudios similares, observamos que no existe una uniformidad de criterios, de forma que encontramos estudios donde siendo evidente la relación entre la hipersensibilidad a la leche de vaca y las enfermedades atópicas, esta relación se muestra fundamentalmente positiva en el caso de pacientes que tienen antecedentes familiares de intolerancia a las proteínas de leche de vaca, a la lactosa o bien que sufren enfermedades atópicas siendo mucho menos evidente en el resto de los pacientes a estudio.

Así, tenemos que tener en cuenta trabajos como de Iacomo et al., en 1998<sup>65</sup> donde además de la influencia familiar, extraemos otras consecuencias, como son, el que la intolerancia a las proteínas de la leche de vaca, evoluciona con el tiempo y además, esta intolerancia, aumenta la frecuencia, en estos pacientes de alergias a otros alimentos.

Otro estudio interesante, es el de Marini et al.<sup>66</sup>, en 1996, donde se demuestra que controlar la dieta de los lactantes alérgicos, evitando la leche de vaca, mejora la respuesta clínica, de estos pacientes, a lo largo del tiempo. Este trabajo, enfrentó un grupo control integrado por 80 niños atópicos, frente a un grupo de intervención integrado por 279 niños atópicos, obteniendo como conclusión más interesante, que tras un año de estudio, sufrían síntomas un 11,5% del grupo de intervención frente al 54,6% del grupo control, tras dos años era un 14,9% del grupo de intervención frente al 65,6% del grupo control y en el tercer año fueron un 20,6% del grupo de intervención frente al 74,1% del grupo control.

Halken, por su parte, en un estudio del año 2004 hace referencia al interés de controlar el uso de leches hidrolizadas para lactantes por su relación en la aparición de enfermedades atópicas. Este trabajo se hizo desde un punto de vista preventivo<sup>45</sup>.

En esta misma dirección, tenemos que hacer referencia a la excelente revisión de Murano et al, en el año 2004, donde se demuestra que, de nuevo en lactantes, el uso de leches exentas de leche de vaca reduce la alergenicidad de estos pacientes<sup>40,41,42</sup>.

No obstante, también hay estudios, como el de García et al., donde se extrae la conclusión de que la incidencia de la alergia a las proteínas de la leche de vaca, en lactantes, es tan pequeña que no merece la pena someter a estos niños a dietas especiales<sup>67</sup>.

Estos estudios, demuestran que la supresión de leche de vaca, sobre todo en la lactancia, se puede considerar un factor de prevención contra enfermedades alérgicas como la rinitis alérgica, la dermatitis atópica e incluso el asma, y esta prevención se extiende no sólo durante los primeros años de la infancia, sino también hasta la adolescencia, pero no detallan datos de su influencia en la población adulta.

De hecho, se ha intentado comparar la frecuencia de aparición de enfermedades alérgicas en aquellos pacientes que consumían leche de vaca, lactancia materna o bien bebida de soja,

demostrando que sobre todo en los pacientes con historia familiar alérgica, la supresión de la leche de vaca y su sustitución por fórmulas de soja, se mostraba eficaz en la prevención de las enfermedades alérgicas, pero de nuevo este estudio igualmente se centra en las edades infantiles, así encontramos que trabajos como el de Pourpak et al., en el año 2004, éste llega a la conclusión de que el consumo de proteínas de leche de vaca influyen en la aparición de enfermedades alérgicas y Gruskay en 1982, postulaba esta posible influencia<sup>67,69,70</sup>.

Incluso, se han buscado que moléculas son las responsables de la antigenicidad que presenta la leche de vaca en muchos de los pacientes atópicos, así, hemos encontrado estudios como Lin Hy et al, en 1998, en el cual encontramos los diversos porcentajes de antigenicidad de las proteínas de la leche de vaca, afirmando que la alpha S1- Caseína es la que más porcentaje presenta, llegando a encontrarse en 36,7% de los pacientes alérgicos, afirmación que respalda posteriormente Elsayed S et Al., en su trabajo de 2004 "Evaluation of the allergenicity and antigenicity of bovine-milk alphas1-casein using extensively purified synthetic peptides"<sup>71,72</sup>

También, hemos encontrado trabajos que demuestran la existencia de epitopos de reconocimiento a estas moléculas, en la superficie de las células T, así, el trabajo de Elsayed S, Eriksen J, Oysaed LK, Idsoe R, Hill DJ, en su trabajo de 2004 "T cell recognition pattern of bovine milk alphaS1-casein and its peptides" demuestran la presencia de receptores de péptidos de alpha S1- Caseína en linfocitos CD4 + TH1 y CD4 + TH2<sup>73,74</sup>.

## **8. CONCLUSIONES**

Tras el análisis de los resultados y tras el contraste de hipótesis, las conclusiones en relación a los objetivos son las siguientes:

1. Para el Objetivo Especifico o Primario, se puede afirmar que el consumo de leche de vaca influye negativamente, en la aparición de episodios de Rinitis Alérgica, aumentando su frecuencia.
2. En relación al objetivo secundario, por una parte, se puede afirmar que el consumo de leche de vaca favorece la aparición de síntomas relacionados con la RA. Además, encontramos que el consumo de leche de vaca, influye moderadamente, en la aparición de episodios de dermatitis atópica, pero no influye, en absoluto, en la aparición de síntomas de asma.

Estos resultados, parecen indicar, sin lugar a duda, que el consumo de leche de vaca interviene muy negativamente, en el desarrollo de la enfermedad rinitis alérgica, de aquí que la recomendación más importante en lo que se refiere a la práctica clínica, sería evitar el consumo de este alimento a aquellos pacientes diagnosticados de esta enfermedad.

No obstante, somos conscientes de que este estudio tiene que ser sólo el punto de partida de otros trabajos más amplios, en pacientes y en duración, que confirmen o descarten los resultados de nuestro trabajo, dada la importancia de tan prevalente enfermedad y de la responsabilidad del consejo dietético consistente en retirar el consumo de leche.



## **9. ANEXOS**

### ***Anexo 1: Carta enviada para solicitar al paciente, su inclusión en el estudio:***

**Estimado paciente:**

**Me dirijo a ti para pedir tu cooperación.**

**Como sabes, estoy muy interesado en el estudio de las enfermedades alérgicas, y es por esto, que bajo la dirección del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández, estoy realizando una Tesis Doctoral, que nos aporte información científica, la cual, tal vez nos permitirá encontrar mejores pautas terapéuticas para este grupo de enfermedades tan molestas y cada vez mas frecuentes.**

**Tu colaboración es sencilla, únicamente, tendrás que rellenar unos cuestionarios que periódicamente te enviaré, cuestionarios que no incluyen nada mas que datos clínicos, que son absolutamente anónimos; con lo cual se asegura la intimidad de los datos que nos aportéis todos aquellos que queráis colaborar en éste proyecto.**

**Una vez hayas cumplimentado los citados cuestionarios, concertaremos una cita, en consulta, para proceder a realizarte las exploraciones y exámenes que sean oportunos, para asegurar el buen seguimiento clínico a lo largo de todo el estudio, cita que por supuesto será gratuita, dado que se trata de un ensayo clínico.**

**También será necesario, tu compromiso en seguir unas determinadas pautas terapéuticas, así como unas recomendaciones dietéticas determinadas.**

**Como te he dicho, periódicamente recibirás en tu domicilio una encuesta con un sobre ya franqueado para remitírmela cuando la hayas rellenado.**

**De aceptar ser incluido en estudio, te ruego firmes tu consentimiento, así como, procedas a complimentar la primera encuesta clínica que va adjunta a esta carta.**

**Te agradezco anticipadamente tu colaboración, que te aseguro, será de gran utilidad para entender mejor las enfermedades alérgicas, y así de este modo poder tratarlas cada vez con más eficacia.**

**Afectuosamente.**

**Fdo: ..... - Medico Naturista**

**Nombre del paciente y Firma de aceptación a ser incluido en el estudio.**

## **Anexo 2: modelo de la encuesta Clínica inicial:**

INICIALES DEL NOMBRE Y APELLIDOS

(POR EJEMPLO JUAN MARTINEZ GARCIA: JMG).....

FECHA DE NACIMIENTO (día/mes/año).....

OCUPACION.....

=====

### ANTECEDENTES FAMILIARES

¿Algún pariente próximo (abuelos, padres, hermanos, hijos o tíos) ha sufrido o sufre alguna de las siguientes enfermedades o alguno de los siguientes síntomas clínicos?

Señalar en caso afirmativo

- Rinitis alérgica
- Asma
- Mucosidad nasal
- Estornudos frecuentes
- Conjuntivitis frecuente
- Dificultad respiratoria (fatiga)
- Eczemas de contacto
- Congestión nasal
- Prurito o picor nasal
- Aparición de manchas con picores en piel
- Dermatitis atópica

### ANTECEDENTES PERSONALES

¿Ha sufrido o sufre alguna de las siguientes enfermedades o síntomas clínicos? Señalar en caso afirmativo

- Rinitis alérgica   en caso afirmativo ¿aproximadamente cuántas crisis en el ultimo año? .....
- Asma  en caso afirmativo ¿aproximadamente cuántas crisis en el ultimo año? .....
- Dermatitis atópica  en caso afirmativo ¿aproximadamente cuántas crisis en el ultimo año? .....
- Estornudos frecuentes  en caso afirmativo ¿aproximadamente cuántas crisis en el ultimo año? .....
- Conjuntivitis frecuente  en caso afirmativo ¿aproximadamente cuántas crisis en el último año? .....

- Dificultad respiratoria (fatiga)  en caso afirmativo ¿aproximadamente cuántas crisis en el último año? .....
- Eczemas de contacto  en caso afirmativo ¿aproximadamente cuántas crisis en el último año? .....
- Congestión nasal  en caso afirmativo ¿aproximadamente cuántas crisis en el último año? .....
- Picor nasal  en caso afirmativo ¿aproximadamente cuántas crisis en el último año? .....
- Aparición de manchas pruriginosas (con picores) en piel  en caso afirmativo ¿aproximadamente cuántas crisis en el último año? .....
- Hipertensión Arterial
- Diabetes
- Colesterol alto
- ¿Ha sufrido algún proceso respiratorio grave?  , en caso afirmativo ¿cuál? .....
- ¿Ha sufrido algún proceso cardíaco grave?  , en caso afirmativo ¿cuál? .....
- ¿Ha sufrido algún proceso renal grave?  , en caso afirmativo ¿cuál? .....
- ¿Ha sufrido algún proceso digestivo grave?  , en caso afirmativo ¿cuál? .....
- ¿Ha sufrido alguna intervención quirúrgica?  , en caso afirmativo ¿cuál? .....
- ¿Ha sufrido alguna otra enfermedad?  , en caso afirmativo ¿cuál? .....
- ¿Toma en este momento alguna medicación?  , en caso afirmativo ¿cuál o cuales? .....

### HABITOS PERSONALES

Señalar en caso afirmativo

- ¿Hace ejercicio frecuentemente?
  - ¿Consume habitualmente frutas?
  - ¿Consume habitualmente verduras?
  - ¿Consume habitualmente cereales?
  - ¿Consume habitualmente hortalizas?
  - ¿Consume habitualmente pescado?
  - ¿Consume habitualmente legumbres?
  - ¿Consume habitualmente carne?
  - ¿Consume habitualmente leche de vaca?
  - ¿Consume habitualmente queso?
  - ¿Consume habitualmente yogurt?
  - ¿Consume habitualmente otros lácteos?
  - ¿Fuma?  en caso afirmativo ¿cuántos cigarrillos al día? .....
  - ¿Consume habitualmente alcohol?
  - ¿Consume habitualmente café o Té?
- ¿Tiene algún animal de compañía?  , en caso afirmativo ¿cuál o cuales?.....

### Anexo 3: Encuesta Inicial - Variables

NOMBRE DE LA VARIABLE	TIPO VARIABLE	RELACION CON LOS OBJETIVOS
SEXO:	CUALITATIVO: Varones Mujeres	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> </ul>
EDAD (años)	CUANTITATIVO	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> <li>Criterio de Inclusión / Exclusión</li> </ul>
ANTECEDENTES FAMILIARES	CUALITATIVO	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> </ul>
ANTECEDENTES PERSONALES	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> </ul>
CONSUME ALCOHOL	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> </ul>
CONSUME TABACO	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> </ul>
ANIMALES DOMESTICOS	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> </ul>
CONSUME OTRA MEDICACION	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> <li>Criterio de Inclusión / Exclusión</li> </ul>
RINORREA	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> <li>Criterio de Inclusión / Exclusión</li> </ul>
ESTORNUDOS	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> <li>Criterio de Inclusión / Exclusión</li> </ul>
CONGESTION NASAL	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> <li>Criterio de Inclusión / Exclusión</li> </ul>

<b>PICOR NASAL</b>	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> <li>• Criterio de Inclusión / Exclusión</li> </ul>
<b>SINTOMAS OCULARES DE LA R.A.</b>	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> <li>• Criterio de Inclusión / Exclusión</li> </ul>
<b>DIFICULTAD RESPIRATORIA</b>	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> </ul>
<b>CRISIS DE ASMA</b>	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> </ul>
<b>DERMATITIS A.</b>	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> </ul>
<b>ECZEMAS</b>	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> </ul>
<b>MANCHAS PRURIGINOSAS</b>	CUALITATIVO: SI/NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analizar comparabilidad inicial y factor asociado a respuesta intervención</li> </ul>

**Anexo 4: Carta enviada a los pacientes incluidos en el grupo control con las pautas terapéuticas y dietéticas**

Estimado paciente:

De nuevo, me dirijo a ti para pedir tu cooperación.

Como recordarás, en el mes de marzo te envié una carta solicitando tu colaboración en un estudio clínico, necesario para la realización de mi tesis doctoral.

En esta carta, te comentaba que tu colaboración consistiría en el seguimiento de unas pautas terapéuticas y dietéticas, así como la cumplimentación de unos cuestionarios que periódicamente recibirás en tu casa y que deberás cumplimentar y devolverme en el sobre pre flanqueado que encontrarás junto con los citados cuestionarios.

En cuanto a las pautas terapéuticas, te solicito, que mantengas los tratamientos médicos que sigues en este momento.

Sobre las medidas dietéticas, te solicito que continúes consumiendo leche de vaca, como haces hasta el momento, rogándote, que en caso de precisar la retirada del consumo de leche de vaca de tu dieta, por cualquier razón, me lo comuniques lo más pronto posible.

Si a lo largo del estudio, sufrieras un agravamiento de tu cuadro clínico, u otro proceso clínico, igualmente, te ruego te pongas en contacto conmigo inmediatamente

Agradeciendo anticipadamente tu colaboración.

Afectuosamente.

Fdo: .. - Medico Naturista

**Anexo 5: Carta enviada a los pacientes incluidos en el grupo de intervención con las pautas terapéuticas y dietéticas**

Estimado paciente:

De nuevo, me dirijo a ti para pedir tu cooperación.

Como recordarás, en el mes de marzo te envié una carta solicitando tu colaboración en un estudio clínico, necesario para la realización de mi tesis doctoral.

En esta carta, te comentaba que tu colaboración consistiría en el seguimiento de unas pautas terapéuticas y dietéticas, así como la cumplimentación de unos cuestionarios que periódicamente recibirás en tu casa y que deberás cumplimentar y devolverme en el sobre pre flanqueado que encontrarás junto con los citados cuestionarios.

En cuanto a las pautas terapéuticas, te solicito, que mantengas los tratamientos médicos que sigues en este momento.

Sobre las medidas dietéticas, te solicito que mientras dure este estudio, dejes de consumir leche de vaca en tu dieta habitual.

Si por alguna razón, te fuera imposible o significara una gran inconveniencia de algún tipo la privación del consumo de leche de vaca, es necesario que me lo comuniques lo más pronto posible.

Si a lo largo del estudio, sufieras un agravamiento importante de tu cuadro clínico, u otro proceso clínico importante, igualmente, te ruego te pongas en contacto conmigo inmediatamente

Agradeciendo anticipadamente tu colaboración.

Afectuosamente.

Fdo: .. - Medico Naturista

## **Anexo 6: Encuestas de seguimiento**

INICIALES DEL NOMBRE Y APELLIDOS: .....

FECHA DE NACIMIENTO (día/mes/año).....

### SEGUIMIENTO CLINICO

Señalar en caso afirmativo:

¿En el periodo de tiempo transcurrido desde la última encuesta, ha sufrido o sufre alguna de las siguientes enfermedades o síntomas clínicos? :

- Rinorrea (moqueo profuso y claro)
- Asma
- Dermatitis atópica
- Estornudos frecuentes
- Conjuntivitis frecuentes
- Dificultades respiratorias ( fatiga )
- Eczemas
- Congestión nasal
- Picor nasal
- Aparición de manchas pruriginosas (con picores) en piel
- ¿Mantiene el tratamiento indicado en la última consulta?
- Con relación a los síntomas anteriormente consultados, preciso algún otro tratamiento medico en este periodo si  no
- ¿Consume habitualmente leche de vaca?



## **10. BIBLIOGRAFIA**

1. **Johansson SG, et al.** A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001; 56: 813 - 24
2. **Settipane RA.** Rhinitis: a dose of epidemiological reality. *Allergy Asthma Proc* 2003; 24: 147-54.
3. **Aberg N, Hesselmar B, Aberg B, Eriksson B.** Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 199 and 1991. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 814-9
4. **Sly RM.** Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma. *Ann Allergy Ummunol* 1999; 82: 233-48
5. **Arnedo-Pena A. et Al.** Evolución temporal de la prevalencia de síntomas de rinitis alérgica en escolares de 13 – 14 años de 8 áreas españolas entre 1993 – 1994 y 2001 – 2002 según el Estudio Internacional sobre Asma y Alergias en la Infancia (ISAAC). *Med. Clin.* 2004; 123: 490-5
6. **Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, Martinez F, et al.** International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J.* 1995; 8: 483-91
7. **Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N.** Aria Workshop Group and World Health Organization. Allergic rhinitis and impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:334
8. **Densupsoontorn N, Jirapinyo P, Thamonsiri N, Chantaratin S, Wongarn R.** Lactose intolerance in Thai adults. *J Med Assoc Thai.* 2004.87: 1501-5.
9. **Bahna SL, Gandhi MD.** Milk hypersensitivity. II. Practical aspects of diagnosis, treatment and prevention. *Ann Allergy.* 1983. 50: 295-301.
10. **Fiocchi A, Restani P, Leo G, Martelli A, Bouygue GR, Terracciano L, Ballabio C, Valsasina R.** Clinical tolerance to lactose in children with cow's milk allergy. *Pediatrics.* 2003. 112: 359-62.
11. **Roitt, Brostoff, Male.** Introducción al sistema inmunitario. En: Diorkí, ed. *Inmunología.* 4ª ed. Madrid. Harcourt Brace 1998. p. 1.1 1.12
12. **Host A, Koletzko B, Dreborg S, et al.** Dietary products used in infants for treatment and prevention of food allergy. *Arch Dis Child.*1999. 81: 80 –84
13. **Marmouz F.** Childhood allergic rhinitis. *Allerg Immunol (Paris)* 2000. 32: 381-387.

14. **Host A.** Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy. Some clinical, epidemiological and immunological aspects. *Pediatr Allergy Immunol* 1994. 5: 1-36
15. **Valente, J.** Epidemiología y factores de riesgo de la rinitis alérgica y las enfermedades alérgicas. *Alergia Asma e Inmunología pediátricas*. 2001. 10: 32.
16. **Argimón Pallás, JM, Jiménez Villa J.** Objetivo del estudio. En: Doyma libros SA ed. *Métodos de Investigación aplicados a la atención primaria de la salud*. Madrid. Harcourt Brace. 1996: 61-67
17. **Argimón Pallás, JM, Jiménez Villa J.** Estudios experimentales. En: Doyma libros SA ed. *Métodos de Investigación aplicados a la atención primaria de la salud*. Madrid. Harcourt Brace. 1996: 19 – 31
18. **Argimón Pallás, JM, Jiménez Villa J.** Tamaño de la muestra. En: Doyma libros SA ed. *Métodos de Investigación aplicados a la atención primaria de la salud*. Madrid. Harcourt Brace. 1996: 77 - 90
19. **Argimón Pallás, JM, Jiménez Villa J.** Tabla C: Número de sujetos necesarios en cada grupo de estudio para la comparación de dos proporciones. En: Doyma libros SA ed. *Métodos de Investigación aplicados a la atención primaria de la salud*. Madrid. Harcourt Brace. 1996: 258
20. **International Consensus Report On The Diagnosis And Management Of Rhinitis:** International Rhinitis Management Working Group. 1994. *Allergy*. 1994. 9: 1 – 34.
21. **Argimón Pallás, JM, Jiménez Villa J.** Recogida de datos. En: Doyma libros SA ed. *Métodos de Investigación aplicados a la atención primaria de la salud*. Madrid. Harcourt Brace. 1996: 123 - 133
22. **Argimón Pallás, JM, Jiménez Villa J.** Elección de sujetos. En: Doyma libros SA ed. *Métodos de Investigación aplicados a la atención primaria de la salud*. Madrid. Harcourt Brace. 1996: 69 - 76
23. **Argimón Pallás, JM, Jiménez Villa J.** Cuestionarios. En: Doyma libros SA ed. *Métodos de Investigación aplicados a la atención primaria de la salud*. Madrid. Harcourt Brace. 1996: 135 - 148
24. **Argimón Pallás, JM, Jiménez Villa J.** Medición de variables. En: Doyma libros SA ed. *Métodos de Investigación aplicados a la atención primaria de la salud*. Madrid. Harcourt Brace. 1996: 110 - 121

25. **Argimón Pallás, JM, Jiménez Villa J.** Papel de la estadística. En: Doyma libros SA ed. Métodos de Investigación aplicados a la atención primaria de la salud. Madrid. Harcourt Brace. 1996: 151 - 165
26. **Argimón Pallás, JM, Jiménez Villa J.** Plan general de la investigación. En: Doyma libros SA ed. Métodos de Investigación aplicados a la atención primaria de la salud. Madrid. Harcourt Brace. 1996: 8 – 11
27. **Argimón Pallás, JM, Jiménez Villa J.** Interpretación de los resultados. En: Doyma libros SA ed. Métodos de Investigación aplicados a la atención primaria de la salud. Madrid. Harcourt Brace. 1996: 187 - 194
28. **Ley orgánica 15/1999**, de 13 de diciembre, de Protección De Datos De Carácter Personal (BOE núm. 298, de 14-12-1999, pp. 43088-43099)
29. **Ley 41/2002**, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. (BOE núm. 274 de 15 -11- 2002. pp. 40126 – 40132)
30. **Real decreto 561/1993**, de 16 de abril, por el que se establecen los requisitos para la realización de ensayos clínicos con medicamentos (BOE núm. 114 de 13 de mayo [RCL 1993,1476]).
31. **Commission Directive 2005/28/EC** of 8 April 2005 laying down principles and detailed guidelines for good clinical practice as regards investigational medicinal products for human use, as well as the requirements for authorisation of the manufacturing or importation of such products
32. **Demoly P, Allaert Fa, Lecasble M, Bousquet J.** Validation of the classification of ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma). Allergy. 2003. 58: 672-5.
33. **Strachan D, et al.** Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). Pediatr Allergy Immunol. 1997. 8:161-76.
34. **[No authors listed]** Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Lancet. 1998. 351: 1225-32.
35. **Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra J.** Alergia e hipersensibilidad. En Aleu SA, ed. Inmunología. 4ª ed. Barcelona: Masson; 2000. p. 461 - 484
36. **Regueiro, JR, Lopez Larrea, C.** Excesos de la Inmunidad: Alergias y otras Hipersensibilidades. En: Inmunología Biología y patología del Sistema Inmune. 2ª ed.

Madrid: Panamericana 1997. p. 141 – 146

37. **Woods RK, Thien F, Raven J, Walters EH, Abramson M.** Prevalence of food allergies in young adults and their relation to asthma, nasal allergies, and eczema. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2002. 88 : 183 – 9.
38. **Cantani A, Micera M.** Natural History of cow`s milk Allergy. An eight-year follow-up study in 115 atopic children. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2004. 8 : 153 – 164.
39. **Novembre E, Vierucci A.** Milk Allergy/intolerance and atopic dermatitis in infancy and childhood. *Allergy.*2001. 56: 105 – 8.
40. **Muraro A, et al.** Dietary prevention of allergic diseases in infants and small children. Part I: immunologic background and criteria for hypoallergenicity. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004. 15:103-11.
41. **Muraro A, et al.** Dietary prevention of allergic diseases in infants and small children. Part II. Evaluation of methods in allergy prevention studies and sensitization markers. Definitions and diagnostic criteria of allergic diseases. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004. 15: 196-205.
42. **Muraro A, et al.** Dietary prevention of allergic diseases in infants and small children. Part III: Critical review of published peer-reviewed observational and interventional studies and final recommendations. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004. 15:291-307.
43. **Muraro A, et al.** Dietary prevention of allergic diseases in infants and small children. Part III: Critical review of published peer-reviewed observational and interventional studies and final recommendations. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004. 15:291-307.
44. **Ishida Y, Nakamura F, Kanzato H, Sawada D, Hirata H, Nishimura A, Kajimoto O, Fujiwara S.** Clinical Effects of Lactobacillus acidophilus Strain L-92 on Perennial Allergic Rhinitis: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *J Dairy Sci.* 2005. 88: 527-33.
45. **Cantani A, Micera M.** Epidemiology of atopy in 220 children. Diagnostic reliability of skin prick tests and total and specific IgE levels. *Minerva Pediatr.* 2003. 55:129-37, 138-42.
46. **Halken S.** Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004. 15: 4-5, 9-32.
47. **Marks RG.** Designing a research Project: the basics of biomedical research methodology. Belmont. Lifetime Learning Publications, 1982.
48. **Diamond GA, Forrester JS.** Clinical trials and statistical verdicts: probable grounds

- for appeal. *Ann Intern Med.* 1983. 98: 385-394
49. **Argimón Pallás, JM, Jiménez Villa J.** Papel de la estadística. En: Doyma libros SA ed. *Métodos de Investigación aplicados a la atención primaria de la salud.* Madrid. Harcourt Brace. 1996: 151 - 165
  50. **Porta M, Plasencia A, Sanz FL.** Calidad de la información clínica (III): ¿estadísticamente significativo o clínicamente importante? *Med Clin (Barc)* 1988. 90: 463-468.
  51. **Donner A.** A bayesian approach to the interpretation of subgroup results in clinical trials. *J, Chron Dis* 1982. 35: 429-435.
  52. **Altman DG.** Statistic and ethics in medical resears: VII. Interpreting results. *Br Med J* 1980. 281: 1621-1614.
  53. **Boissel JP.** Planning of clinical trials. *J Intern Med.* 2004. 255: 427-38.
  54. **Argimón Pallás, JM, Jiménez Villa J.** Tabla C: Sujetos a incluir en el análisis. En: Doyma libros SA ed. *Métodos de Investigación aplicados a la atención primaria de la salud.* Madrid. Harcourt Brace. 1996: 177 - 185
  55. **David, P. Skoner, MD.** Allergic rhinitis: Definition, epidemiology, pathophysiology, detection and diagnosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2001. 108: 2S – 8S
  56. **May GS, De Mets DL, Friedman LM, Furberg CD, Passamani E.** The randomized clinical trial: bias in analysis. *Circulation* 1981. 64: 669- 673
  57. **Ellenberg JH, Nelson KB.** Sample selection and the natural history of disease:studies of febrile seizures. *JAMA* 1980. 243: 1337 – 1340
  58. **Grande Covian F.** La alimentación y la vida. Barcelona. Ed Debate. 2000.
  59. **Argimón Pallás, JM, Jiménez Villa J.** Muestreo. En: Doyma libros SA ed. *Métodos de Investigación aplicados a la atención primaria de la salud.* Madrid. Harcourt Brace. 1996: 91 - 100
  60. **Sachs L.** Estadística Aplicada. Barcelona. Labor.1978
  61. **Armitage P.** Exclusions, losses of folow-up and withdrawals. En: clinical trials. En: Shapiro SH, Louis TA, eds. *Clinical trials: issues and approaches.* Nueva York, Marcel Dekker. 1983
  62. **Rothman KJ.** Modern Epidenology. Boston, Little, Brow & Cp. 1986
  63. **The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)** Steering Commitee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 1998;351:1225-1232.
  64. **Hanifin JM.** Atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1984. 73: 211-26.

65. **Iacono G, Cavataio F, Montalbo G, Soresi M, Notarbartolo A, Carroccio A.** Persistent cow's milk protein in infants: the changing faces of the same disease. *Clin Exp Allergy*.1998. 28: 817 – 23
66. **Marini A, Agosti M, Motta G, Mosca F.** Effects of a dietary and environmental prevention programme on the incidence of allergic symptoms in high atopic risk infants: three years' follow – up. *Acta Paediatr Suppl*. 1996. 414: 1 – 21.
67. **García Ara MC, et al.** Incidencia de alergia a proteínas de leche de vaca en el primer año de vida y su repercusión en el consumo de hidrolizados. *An Pediatr*, 2003. 58: 100-5
68. **Oddy WH, De Klerk NH, Sly PD, Holt PG.** The effects of respiratory infections, atopy, and breastfeeding on childhood asthma. *Eur Respir J*. 2002.19: 899-905
69. **Pourpak Z, et al.** The role of cow milk allergy in increasing the severity of atopic dermatitis. *Immunol Invest*. 2004. 33: 69-79.
70. **Gruskay FL.** Comparison of breast, cow, and soy feedings in the prevention of onset of allergic disease: a 15-year prospective study. *Clin Pediatr (Phila)*. 1982. 21: 486-91
71. **Lin HR, Shyur SD, Fu JL, Lai YC.** Whey and casein specific IgE and the cow's milk challenge test for atopic children. *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi*. 1998. 39: 99-102.
72. **Elsayed S, Hill DJ, Do TV.** Evaluation of the allergenicity and antigenicity of bovine-milk alphas1-casein using extensively purified synthetic peptides. *Scand J Immunol*. 2004. 60: 486-93.
73. **Vila L, Beyer K, Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA.** Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy*. 2001. 31: 1599-606.
74. **Elsayed S, Eriksen J, Oysaed LK, Idsoe R, Hill DJ.** T cell recognition pattern of bovine milk alphaS1-casein and its peptides. *Mol Immunol*. 2004. 41: 1225-34.