

Niveles de interleucinas en sangre de cordón: relación con antecedentes familiares de enfermedad alérgica

P. Cárdenas Guerrero^a, J.M. Fernández Lorenzo^a, A. Martínez-Cañavate Burgos^a, A. Ramírez^b, M. de Felipe Jiménez-Casquet^a, A. Pérez Aragón^a, A. Rojo Hernández^a y M. Montoya Aguado^b

^aUnidad de Alergia Infantil. ^bServicio de Medicina Nuclear. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

RESUMEN

Introducción: El desarrollo de patología alérgica se produce como consecuencia de una alteración de la inmunidad natural, y una alteración de los mecanismos de protección corporales, dando lugar a una respuesta errónea o exagerada frente a antígenos normalmente inocuos, que genera cuadros clínicos con manifestaciones cutáneas, digestivas y/o respiratorias. Es una respuesta mediada por inmunoglobulina E.

La frecuencia y distribución de este proceso ha sufrido un incremento desde la década de 1970, lo que hace que exista un mayor interés en el conocimiento de los mecanismos que producen esta clínica.

La mediación por inmunoglobulina E está regulada por la respuesta de linfocitos Th 1 representada por la interleucina 2 y el gamma interferón que inhiben su producción, y la respuesta de linfocitos Th 2 configurada por la interleucina 4, interleucina 10 e interleucina 13 que estimulan la producción de inmunoglobulina E.

Material y métodos: Se presenta un estudio de casos y controles con una muestra de 70 recién na-

cidos considerando antecedentes familiares de primer grado de enfermedad alérgica (47 no, 23 sí). Se miden valores en sangre de cordón de interleucinas 4, 10, 13 e interferon gamma (kits CLB y método ELISA).

Resultados: No se han obtenido valores para interleucina 4 y 13. Se ha visto mayores valores de interleucina 10 en hijos de madre o hermano afecto (madre afecta IL 10 = 48,7 pg/ml, frente a madre no afecta IL 10 = 31,62 pg/ml, $p = 0,081$, no significativo), (hermano afecto IL 10 = 72,8 pg/ml, frente a hermano no afecto IL 10 = 32,31, $p = 0,0062$, significativo). No se obtiene diferencia para interferon gamma.

Discusión: Como ya se ha puesto de manifiesto en otros estudios, la interleucina 10 aumenta en sangre de cordón en niños cuya madre es la que presenta la enfermedad. Destaca el aumento de interleucina 10 en sangre de cordón de niños con hermano afecto de enfermedad alérgica. Todavía queda mucho por hacer, y mediante seguimiento posterior se espera obtener resultados de interés.

Palabras clave: Enfermedad alérgica. Interleucinas. Gamma interferon. IgE. Sangre de cordón.

Estudio SAS n.º 213/01.

Correspondencia:

P. Cárdenas Guerrero
Hospital Universitario Virgen de las Nieves
Consulta de Alergia Infantil
Avda. Fuerzas Armadas, s/n
18014 Granada
Correo electrónico: purinarpi@yahoo.es

Interlukin levels in umbilical cord blood: relationship with a family history of allergic disease

ABSTRACT

Background: The development of allergic pathology takes place as result of an alteration of the immunity and alteration of the corporal mechanism of pro-

tection, giving rise to an erroneous answer or exaggerated forehead to innocuous antigens, that it generates clinical symptoms with cutaneous, digestive or respiratory manifestations.

The frequency and distribution of this process have undergone an increase from the 1970, which causes that a greater interest in the knowledge of the mechanisms exists that produce this clinic.

The answer by immunoglobulin E is regulated by the answer of lymphocytes T-helper-1 represented by interleukin 2 and gamma-interferon that inhibits their production, and the answer of lymphocytes T-helper-2 formed by interleukin 4, interleukin 10 and interleukin 13 that stimulate the production of immunoglobulin E.

Methods and results: A study of cases and controls with a sample of 70 appears new born considering antecedent relatives of first degree of allergic disease (47 no, 23 yes). Values in umbilical cord blood were moderate of interleukins 4, 10, 13 and gamma-interferon (kit CLB, and method ELISA).

Values for interleukin 4 and interleukin 13 have not been obtained. One has been greater values of interleukin 10 in children of mother or brother affection (mother affects IL 10 = 48.7 pg/ml, in front of mother does not affect IL 10 = 31.62 pg/ml, p = 0.081, no signification), (brother affection IL 10 = 72.8 pg/ml, in front of brother no affection IL 10 = 32.31 pg/ml, p = 0.0062, is significant). Difference for gamma-interferon was not obtained.

Conclusions: As it has already been shown in other studies, interleukin 10 increases in cord blood in children whose mother is the one who presents the disease.

It emphasizes the increase of interleukin 10 in blood of umbilical cord of children with brother affection of allergic disease. Still it is left much to do and by means of later pursuit it is hoped to obtain interest results.

Key words: Allergy pathology. Interleukin. Gamma-interferon. IgE. Cord blood.

INTRODUCCIÓN

La patología alérgica consiste en la reacción inmune producida por la puesta en contacto del individuo con un antígeno normalmente inocuo, como consecuencia de una desviación de la inmunidad natural, y una alteración de los mecanismos de protección corporales. Es una respuesta mediada por inmunoglobulina E (IgE), que condiciona en un segundo contac-

to la liberación de mediadores que desencadenan el cuadro clínico.

La clasificación de la patología alérgica es:

1. *Alteración de vías respiratorias*, la más frecuente en la edad pediátrica.

2. *Alteración del tracto gastrointestinal* (en forma de reacción de inflamación de parte alta, afectando a lengua, labios, o bien dolor abdominal, vómitos o deposiciones diarreicas en cuadros de anafilaxia gastrointestinal, malabsorción).

3. *Reacción dérmica* (anafilaxia, urticaria, angioedema o exacerbación de una dermatitis atópica ya establecida).

La prevalencia y gravedad de esta patología sigue incrementándose, desde la década de 1970 (en las sociedades desarrolladas alcanza el 20 % de la población, mientras que en los países en vías de desarrollo estas enfermedades afectan entre 2,6 % y 6 % de la población). Este fenómeno es extrapolable a la población infantil.

Los factores etiopatogénicos implicados son:

1. La existencia de antecedentes familiares de enfermedad alérgica, implica una predisposición genética a padecer la enfermedad. De este modo el riesgo de una enfermedad poligénica en los familiares de primer grado es generalmente del 5 al 15 %.

Los genes o regiones implicados se están investigando actualmente en un total de 13 cromosomas humanos, encontrándose ligamiento y fuerte asociación en alelos de los cromosomas 5 y 11 así como de los cromosomas 6 y 14.

2. Se observan variaciones geográficas, relacionadas con factores ambientales, siendo reconocida como enfermedad de la civilización moderna. El incremento observado en las enfermedades alérgicas que se ha producido en las últimas tres décadas, es demasiado rápido para ser atribuido a una mutación genética.

Las posibles influencias ambientales han sido ampliamente estudiadas:

a) La contaminación atmosférica.

b) Los alergenos domésticos.

c) La exposición al humo del tabaco tanto intraútero como en la infancia.

d) Las enfermedades infecciosas y las vacunas.

e) La dieta.

La respuesta alérgica depende de la IgE, iniciándose con la unión del alérgeno a la IgE que está fijada al receptor de alta afinidad localizado en la superficie del mastocito, desencadenando de este modo los síntomas de hipersensibilidad inmediata.

La producción de Ig E está regulada por dos tipos de sustancias producidas por líneas celulares diferentes; linfocitos Th 1 que producen IL 2 y el γ INF, que inhiben la producción de IgE por las células memoria; los linfocitos Th2, que producen IL 4, 10 y 13 que estimulan la producción de IgE, así como la IL 5 con función quimiotáctica de eosinófilos (fig. 1).

La IL 4 es producida por células T, eosinófilos, mastocitos y basófilos, y promueve la activación de células T y la diferenciación hacia el fenotipo Th2, así como la producción de IgE por las células B. La IL 10 es producida por células T, células B, macrófagos y monocitos e inhibe la proliferación de células T y regula a la baja la producción de citocinas proinflamatorias. La IL 13 producida por las células T y basófilos, promueve la producción de IgE por las células B.

El γ INF producido por células T, células NK, macrófagos y eosinófilos, inhibe las células Th2 e inhibe la diferenciación de células B.

Durante el embarazo, se produce un paso de células trofoblásticas del feto hacia la circulación materna. La madre presenta durante ese período un estado Th2 predominante y de este modo se previene el rechazo al aloinjerto fetal, mediado por una respuesta Th1. Este predominio Th2 supone una producción constante de IL 4 e IL 10 durante todo el embarazo; la IL 13 se produce en la placenta de la semana 16 a la 27, y por el feto de la 27 hasta la 37, donde decrece su producción hasta hacerse mínima en el recién nacido a término. En el feto también existe un predominio de respuesta Th2¹⁻³.

En el momento actual, el único *marcador fiable predictivo* aceptado en la comunidad científica como válido para la detección del ulterior desarrollo de enfermedad alérgica es el aumento de IgE en sangre unido a la historia familiar de atopia (el aumento aislado de IgE sin enfermedad familiar de atopia, no es fiable).

El predominio de respuesta Th2 fetal que se ve acentuado en el caso de madres atópicas, debe implicar que la determinación de los valores cuantitativos de las sustancias implicadas en la respuesta Th2 deben estar directamente relacionadas con la susceptibilidad individual al desarrollo de enfermedad atópica, sirviendo por tanto como marcador precoz de alergia. Esto se puede correlacionar con la aparición posterior de alteraciones analíticas que se correspondan con aparición de sintomatología, mediante seguimiento posterior.

OBJETIVOS

Se plantean en este estudio un objetivo general, que consiste en la determinación de los valores de

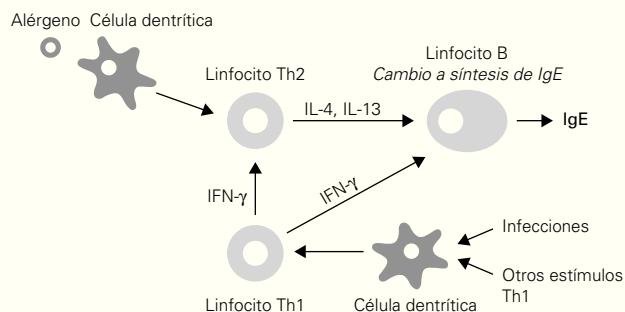


Figura 1.—Síntesis de IgE, regulación.

interleucinas en sangre de cordón en la población, y correlación con antecedentes familiares de enfermedad alérgica. Para ello realizaremos:

1. IL 4, IL 10, IL 13, γ INF en sangre de cordón de recién nacidos sanos, obteniendo valores normales para la población en estudio.
2. IL 4, IL 10, IL 13, γ INF en sangre de cordón de recién nacidos con historia familiar de atopia (respiratorio, dérmico, alergia a medicamentos) en primer grado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio de casos y controles, con un tamaño muestral de 70 niños, 47 en grupo control y en 23 grupo de estudio, en base a error α del 5 % y β del 20 %, con exposición en enfermos de 35 % y en no enfermos de 15 %, relación no enfermos/enfermos 1,9/1 y Odds Ratio de 5,05.

Los sujetos que entran en estudio son niños nacidos en el año 2002. Se solicita autorización paterna para la inclusión del recién nacido en el estudio tras una información detallada del mismo y firma de formulario de consentimiento.

1. El grupo control lo forman los recién nacidos a término sin historia familiar de atopia.
2. El grupo de estudio son recién nacidos con historia familiar de atopia en familiares de primer grado (padre, madre y hermanos).
3. Se excluyen del recién nacido pretérmino (menos de 37 semanas de edad gestacional) y postérmino (más de 42 semanas de edad gestacional), así como parto traumático o con cualquier patología asociada.

Las variables que se analizan son las siguientes:

- *Marcadores clínicos*. Historia clínica familiar en parientes de primer grado (padre, madre y hermanos)

Tabla I
Resultados en IL 10 y γ INF

Antecedentes familiares con enfermedad alérgica	Número	IL 10	γ INF
Madre			
No	53	31,62	1,89
Sí	17	48,75	2,45
Padre			
No	62	37,30	1,96
Sí	8	23,94	2,51
Hermano			
No	64	32,31	1,98
Sí	6	72,81	2,46
Padre y madre			
No	48	32,83	
Sí	3	30,55	
Padre y hermano			
No	58	32,85	
Sí	2	14,68	
Madre y hermano			
No	50	32,19	
Sí	3	123,53	

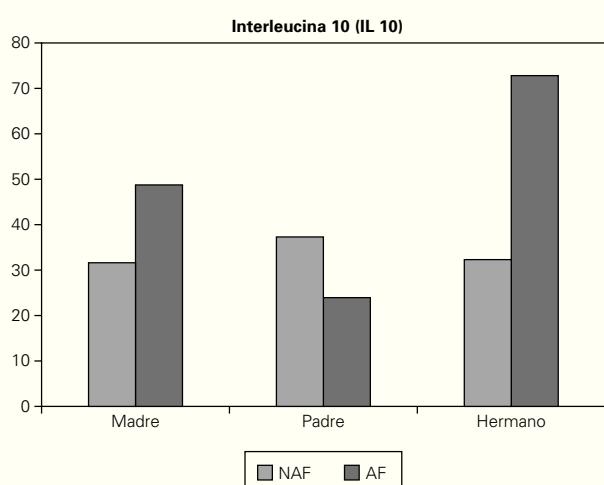


Figura 2.—Valores medios de IL 10 (pg/ml) teniendo en cuenta si hay antecedente familiar de enfermedad alérgica (AF: sí, NAF: no), y qué familiar es el que lo presenta.

de enfermedad alérgica (respiratoria, digestiva, cutánea).

— *Marcadores bioquímicos.* IL 4, 10 y 13, γ INF e IgE en sangre de cordón umbilical. Determinación cuantitativa de citocinas se realizará con los kits CLB, método ELISA (IL 4 sensibilidad 0,2 pg/ml; IL 10 sen-

sibilidad 10 pg/ml; IL 13 sensibilidad 0,5 pg/ml; γ INF sensibilidad 1 pg/ml).

En el análisis de datos las variables citadas se procesarán mediante previa inclusión en una base de datos SPSS versión 11.5, procediéndose a su análisis estadístico:

RESULTADOS

Se ha obtenido los valores de sangre de cordón de IL 4, 10 y 13 así como de γ INF, correlacionando los datos con la existencia de antecedentes de enfermedad alérgica. No se han obtenido valores para IL 4 e IL 13, pero si para IL 10 y γ INF.

Relacionando valores en sangre de cordón con la existencia de antecedente familiar de enfermedad alérgica, se han encontrado para la IL 10 valores más altos en aquellos niños que presentan antecedentes familiares de enfermedad alérgica, pero no en todos los casos resulta significativa (tabla I):

1. Hay nivel mayor de IL 10 en los niños con antecedente de enfermedad alérgica, pero no es significativo ($p = 0,306$) (no antecedente de enfermedad (NAF) 32,74 pg/ml, si antecedente de enfermedad (AF) 41,98 pg/ml).

2. Si la madre es la que presenta la enfermedad, se obtiene un valor de IL 10 mayor (AF 48,75 pg/ml, NAF 31,62 pg/ml), pero no es significativa ($p = 0,081$) (fig. 2).

3. Si es el padre el que presenta la enfermedad, curiosamente obtenemos un valor de IL 10 menor en estos niños (AF 23,94 pg/ml, NAF 37,3 pg/ml), pero no significativo ($p = 0,316$). (fig. 2).

4. Si es algún hermano el que presenta la enfermedad, se obtiene un valor muy superior de IL 10, frente a aquellos sujetos que no tienen hermanos afectos (AF 72,81 pg/ml, NAF 32,31 pg/ml), y si es significativo ($p = 0,0062$) (fig. 2).

5. Si son el padre y algún hermano, o madre y padre los que presentan la enfermedad, no se encuentran valores mayores de IL 10 (fig. 3).

6. Si son la madre y algún hermano los que presentan la enfermedad, si que se encuentran valores mayores de IL 10, y además son significativos (AF 123,53 pg/ml, NAF 32,19 pg/ml) ($p = 0,0003$, ANOVA) (fig. 3).

Para el γ INF se han encontrado valores muy similares tanto si hay antecedentes familiares como si no los hay, no encontrándose diferencia tampoco en relación a quién presente la enfermedad (AF 2,44 pg/ml, NAF 1,82 pg/ml) (fig. 4).

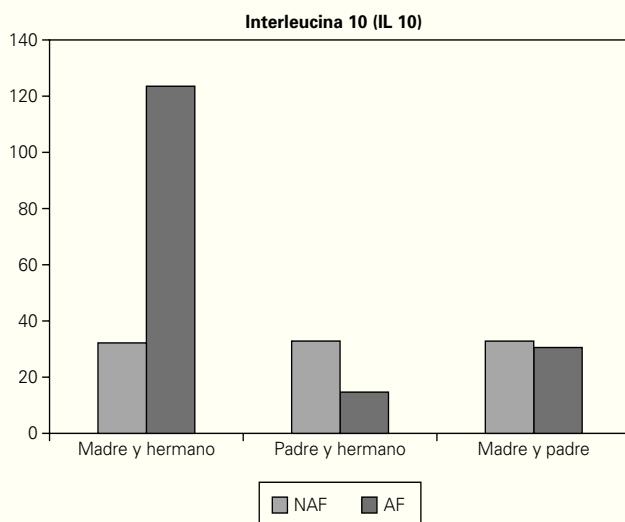


Figura 3.—Valores medios de IL 10 (pg/ml), considerando antecedentes familiares de enfermedad alérgica (NAF: no, AF: sí), con más de un familiar alérgico.

DISCUSIÓN

Son numerosos los estudios que se están realizando en búsqueda de un marcador fiable predictor precoz de enfermedad alérgica, que se presenta en la mayoría de los casos como enfermedad respiratoria. Para ello se establecen seguimientos desde las etapas más precoces de la vida, siendo el período fetal el inicio para la determinación de distintas moléculas que ya en esta etapa puedan predecir la aparición posterior de enfermedad. Así, se comienza a describir el desarrollo de la inmunidad fetal (con predominio Th2) y mecanismos de sensibilización fetal en la gestación, con la influencia tan importante que ejerce el entorno materno y en especial la sensibilización a los antígenos alimentarios¹⁻³. También se determinan citocinas en células de placenta que reflejan distinta respuesta en caso de tratarse de niño con riesgo de enfermedad alérgica⁴.

En estudios realizados en células de sangre de cordón, dirigidos a conocer la inmunidad, el tipo de células que actúan, así como la determinación de sustancias que puedan predecir desarrollo posterior de enfermedad alérgica, no se llega todavía a resultados claros.

Una elevación de IgE en sangre de cordón, se ha relacionado con un desarrollo posterior de enfermedad alérgica si bien por si solo no constituye un marcador sensible de enfermedad^{5,6}. En otros grupos de trabajo se ha evidenciado una modificación de respuesta inmunitaria en relación con la existencia de antecedentes maternos, paternos o ambos. In vitro y mediante estimulación de células mononucleares

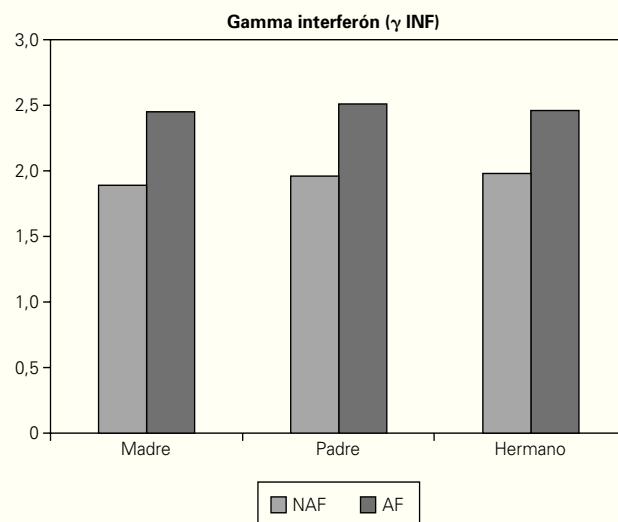


Figura 4.—Valores medios de γ INF (pg/ml) teniendo en cuenta si antecedente familiar de enfermedad alérgica (AF: sí, NAF: no), y que familiar es el que lo presenta.

de sangre de cordón se ha evidenciado una menor respuesta de γ INF (lo que podría implicar una disfunción celular de producción) y mayor de IL 2 o IL 6 en niños que posteriormente desarrollan enfermedad alérgica frente a niños sanos⁶⁻⁸; teniendo en cuenta los antecedentes de enfermedad alérgica en madre, padre o en ambos se ha obtenido una respuesta mayor de IL 4 y descenso de respuesta de γ INF en caso de padre y madre afectados, lo que implica que la carga genética es importante en la enfermedad⁹; otros estudios reflejan mayores niveles de IL 10 en el líquido amniótico de madres atópicas, comparado con el de no atópicas; en recientes estudios *in vitro* se muestra en las células T obtenidas de sangre de cordón, en hijos de madre atópica una disminución de producción de γ INF y un aumento de producción de IL 4 en relación con hijos de madre no atópica.

En los primeros años de vida se ha demostrado en niños atópicos una mayor respuesta Th2 en relación a controles sanos, así como un descenso de respuesta Th1, todo ello medible con la relación IL 4 y γ INF. Los datos son contradictorios y no llegan a conclusiones claras, porque no evidencian modificaciones significativas en la determinación de las distintas citocinas¹⁰⁻¹⁴.

La cuantificación de IgE se presenta como una prueba específica de atopía, pero es poco sensible; el descenso de γ INF no se relaciona con la producción de cuadros alérgicos aunque hay estudios en los que sí existe esta relación¹⁵⁻¹⁷; los niveles de interleucinas en sangre de cordón no reflejan en todos los casos la posibilidad del desarrollo de cuadro asmático; la his-

toria familiar de atopía sí se relaciona con aparición futura de alergia, siendo más sensible si la asociamos a un aumento de IgE^{10,15,18}.

Se ha propuesto la IL 10 como promotora de la acción Th2. Pero en la enfermedad alérgica influyen muchos factores ambientales y la carga genética también es importante, por lo que es necesario establecer el entorno en el que se desarrolla el niño, así como confirmar o no la existencia de padre, madre o hermano con antecedente de enfermedad alérgica.

Hay un trabajo reciente muy interesante que correlaciona los niveles de interleucinas en sangre de cordón con la aparición de enfermedad alérgica, episodios aislados de dificultad respiratoria y atopía (definida como sensibilización a algún agente inhalante), a los 6 años de edad. Concluyen que tienen bajo riesgo de enfermedad los sujetos que tienen niveles detectables en sangre de cordón de IL 4 y γ INF. La correcta respuesta Th1 y Th2 al durante el embarazo y al nacimiento depende de la función de la unidad fetoplacentaria. También introduce el tabaco materno antes y durante el embarazo como modificador de respuesta de interleucinas, y favorecedor de enfermedad en el niño a los 6 años de edad¹⁹.

Como vemos existen estudios encaminados al conocimiento de las bases inmunitarias de la enfermedad alérgica, desde las etapas más tempranas de la vida. Hasta ahora los resultados no son concluyentes, pero si orientativos hacia la relación de que los fenómenos inmunitarios en los niños alérgicos están alterados ya desde el nacimiento. Hoy se sabe que la enfermedad alérgica se relaciona con la existencia de antecedentes familiares junto a elevación desde etapas muy tempranas de IgE.

Hasta ahora de lo analizado, se pone de manifiesto que los valores en sangre de cordón de IL 10 (células Th2) son mayores en caso de antecedente de enfermedad alérgica en madre y hermano o en hermano solo. La enfermedad alérgica en el padre no modifica los valores. Si es la madre la que presenta la enfermedad, se obtienen valores mayores pero no significativos (quizá aumentando la muestra obtendríamos resultados significativos). Según vemos se plantea que no solo hay que tener en cuenta la existencia de antecedente de enfermedad en familiar de primer grado; también es necesario conocer quién la presenta. El descenso de respuesta Th1 no se observa en nuestro estudio, obteniéndose valores similares en ambas muestras de γ INF. La no obtención de valores en las muestras para IL 4 e IL 13 puede deberse a error en el método, si bien es similar al utilizado en otros estudios descritos.

Todavía queda mucho por hacer y analizar, esperando obtener resultados aclaradores y de interés.

BIBLIOGRAFÍA

1. Martín Mateos MA. Mecanismos de sensibilización fetal y neonatal. *Esp Pediatr*. 2001;54 Suppl 4:254-7.
2. Warner JO, Jones CA, Kilburn SA, Vance GH, Warner JA. Prenatal sensitisation in humans. *Pediatr Allergy Inmunol*. 2000;11 Suppl 13:6-8.
3. Warner JA, Jones CA, Jones AC, Warner JO. Prenatal origins of allergic disease. *J Allergy Clin Inmunol*. 2000;105(2 Pt 2):S493-8.
4. Gabrielsson S, Soderlund A, Nilsson C, Lilja G, Nordlund M, Troye-Blomberg M. Influence of atopic heredity on IL 4, IL 12 and INF gamma producing cells in vitro activated cord blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol*. 2001;126(3):390-6.
5. Williams TJ, Jones CA, Miles EA, Warner JO, Warner JA. Fetal and neonatal IL 13 production during pregnancy and at birth and subsequent development of atopic symptoms. *J Allergy Clin Inmunol*. 2000;105(5):951-9.
6. Kaan A, Dimich-Ward H, Manfreda J, Becker A, Watson W, Ferguson A, Chan H, Chan-Yeung M. Cord blood IgE: its determinants and prediction of development of asthma and other allergic disorders at 12 months. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000;84(1):37-42.
7. Kondo N, Kobayashi Y, Shinoda S, Takenaka F, Teramoto T, Kaneko H, Fukao T, matsui E, Kasahara K, Yokoyama Y. Reduced interferon gamma production by antigen-stimulated cord blood mononuclear cells is a risk factor of allergic disorders 6 year follow-up study. *Clin Exp Allergy*. 1998;28(11):1313-6.
8. Liao SY, Liao TN, Chiang BL, Huang MS, Chen CC, Chou CC, Hsieh KH. Decreased production of IFN gamma and increased production of IL 6 by cord blood mononuclear cells of newborn with a high risk of allergy. *Clin Exp Allergy*. 1996;26(4):397-405.
9. Pohl D, Bockelmann C, Forster K, Rieger CH, Schauer U. Neonates at risk of atopy show impaired production of interferon-gamma after stimulation with bacterial products (LPS and SEE). *Allergy*. 1997;52(7):732-8.
10. Spinazzi F, Agea E, Russano A, Bistoni O, Minelli L, Bologni D, Bertotto A, De Benedictis FM. CD4 + IL13 + T lymphocytes at birth and the development of wheezing and/or asthma during the 1st year of life. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;124(4):497-501.
11. Yang YH, Chen MX, Tsai MJ, Lin YT, Chiang BL. Costimulatory molecules expression and cytokine profiles of cord blood mononuclear cells in newborn with low and high risk of developing atopic diseases. *J Microbiol Immunol Infect*. 2000;33(3):159-64.
12. Hagendoren MM, Van Bever HP, Schuerwagh AJ, De Clerck LS, Bridts CH, Stevens WJ. Determination of T cell subpopulations and intracellular cytokine production (interleukin 2, interleukin 4, and interferon gamma) by cord blood T lymphocytes of neonates from atopic and non atopic parents. *Pediatr Allergy Inmunol*. 2000;11(1):12-9.
13. Blanco Quiros A. Síntesis and modulation of IgE in the newborn infant. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1998;26(3):87-90.
14. Miceli Sopo S, Pesaresi MA, Minchilli G, Maraglino V, Guerrini B, Rossodivita A, Satabile A. In vitro IgE synthesis in neonates with different family history of atopy. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1997;25(2):73-9.
15. Smart JM, Kemps AS. Ontogeny of T helper 1 and T helper 2 cytokine production in childhood. *Pediatr Allergy Inmunol*. 2001;12(4):181-7.
16. Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet*. 1999;353(9M8):196-200.

17. Kaminishi K, Soma Y, Kawa Y, Mizoguchi M. Flow cytometric analysis of IL 4, IL 13 and INF-gamma expression peripheral blood mononuclear cells and detection of circulating IL 13 in patients with atopic dermatitis provide evidence for the involvement of type 2 cytokines in the disease. *J Dermatol Sci.* 2002;29(1):19-25.
18. Schade RP, Van Ieperen-Van Dijk AG, Van Rijsen FC, Versluis C, Kimpen JL, Knol Ef, Bruijnzeel-Koomen CA, Van Hoffen E. Differences in antigen-specific T-cell responses between infants with atopic dermatitis with and without cow's milk allergy: relevance of TH2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(6):1155-62.
19. Macaubas C, de Klerk NH, Holt BJ, Wee C, Kendall G, Firth M, Sly PD, Holt PG. Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years. *The Lancet.* 2003;362:1992-7.