

Eficacia clínica y seguridad de la inmunoterapia sublingual con extractos estandarizados en el tratamiento del asma alérgica ocasionada por *Dermatophagoides* en población mexicana pediátrica

Mayor M.C. Tomás **Velarde-Domínguez**,* Mayor M.C. Omar **Talavera-Hernández**,**
Mayor M.C. José Ricardo **Sánchez-Santa Ana**,** Mayor M.C. Luis Felipe **Madrigal-Mendoza****

Hospital Central Militar. Ciudad de México

RESUMEN

Antecedentes. Estudios previos proponen a la inmunoterapia sublingual como una alternativa viable a la inmunoterapia inyectada, demostrando mejoría en la sintomatología, con pocos efectos colaterales; se requieren más estudios para valorar la eficacia y seguridad de este tratamiento en niños.

Objetivo. El propósito del estudio fue valorar la eficacia clínica y seguridad de la inmunoterapia sublingual en población pediátrica mexicana.

Método. Realizamos un estudio aleatorizado, doble ciego, placebo controlado, para valorar la eficacia clínica y seguridad de la inmunoterapia sublingual. Veintinueve niños con asma alérgica a dermatofagoides leve a moderada persistente con tratamiento farmacológico de base fueron aleatorizados para recibir extracto estandarizado sublingual de dermatofagoides (n = 20) o placebo (n = 12) por cuatro meses. Los criterios de valoración de eficacia clínica fueron las calificaciones de síntomas y uso de medicamentos y de seguridad fue el reporte de eventos adversos.

Resultados. La calificación media de medicamentos disminuyó en el grupo con inmunoterapia sublingual ($p < 0.001$) mientras que se observó una $p = 0.23$ en el grupo con placebo con una diferencia significativa. La calificación media de síntomas disminuyó en grupo con fármaco activo ($p < 0.001$) y en el grupo placebo una disminución de ($p = 0.2$), estadísticamente con diferencia significativa.

*Clinical effectiveness and security of the sublingual immunotherapy as a treatment for allergy asthma secondary to *Dermatophagoides* in pediatric population*

SUMMARY

Background. Previous studies propose to the sublingual immunotherapy like a viable alternative to the injected immunotherapy, demonstrating improvement in the symptoms, with few collateral effects; more studies are required to value the effectiveness and security of this treatment in children.

Objective. The purpose of the study was to value the clinical effectiveness and security of the sublingual immunotherapy in Mexican pediatric population.

Method. We carry out a randomized, double blind, controlled placebo study, to value the clinical effectiveness and security of the sublingual immunotherapy. Twenty-nine children with mild to moderate persistent allergic asthma to *Dermatophagoides* with pharmacological treatment of base were randomized to receive standardized sublingual extract of *Dermatophagoides* (n = 20) or placebo (n = 12) during four months. The valuation approaches of clinical effectiveness were the qualifications of symptoms and the use of medications; for security evaluation it was the report of adverse events.

Results. The media qualification of medications diminished in the group with sublingual immunotherapy ($p < 0.001$),

* Jefe del Servicio de Inmunología Clínica y Alergia. Hospital Central Militar.

** Servicio de Inmunología Clínica.

Correspondencia:

Dr. Tomás Velarde-Domínguez
Cozumel No. 62, Col. Roma
C.P. 06700, México, D.F.
E-mail: vela1509@prodigy.net.mx

Recibido: Noviembre 21, 2001.

Aceptado: Enero 22, 2002.

Introducción

La inmunoterapia convencional es eficaz en el tratamiento de rinitis y conjuntivitis alérgicas así como en el asma alérgica provocada por pólenes y ácaros del polvo como lo demuestran múltiples estudios clínicos controlados. Sin embargo, nuevas formas de administración de inmunoterapia están en investigación con el fin de aumentar la seguridad y apego al tratamiento. Basados en datos experimentales, la OMS y la EAACI/ESPACI han aceptado a la inmunoterapia

Conclusión. La inmunoterapia sublingual es segura y clínicamente eficaz en la reducción de síntomas y uso de medicamentos en el tratamiento del asma alérgica por dermatofagoides en pacientes pediátricos seleccionados con asma leve y moderada persistente. Además, es mucho mejor tolerada que la inmunoterapia convencional y favorece el apego al tratamiento, elementos clave en el tratamiento de la población pediátrica.

Palabras clave: inmunoterapia sublingual, asma, dermatofagoides, eficacia.

sublingual (ITS) como una alternativa viable; varios estudios placebo controlados han mostrado la eficacia y seguridad de este tratamiento, pero se requieren más estudios para establecer el lugar de la ITS en el tratamiento de las enfermedades alérgicas en niños. Entre 60 a 85% de los niños que viven en climas tibios y templados están sensibilizados al ácaro del polvo casero. En los niños la presencia de alergia influye en la persistencia y severidad del asma y una alergia perenne a los ácaros del polvo causa inflamación crónica con un grado variable de hiperreactividad bronquial fuertemente asociado al nivel de sensibilización. Los alérgenos asociados con la materia fecal de los ácaros son enzimas que se originan en el tracto digestivo del ácaro, otros alérgenos pueden ser componentes de la saliva, secreciones glandulares y líquidos corporales del ácaro. Debido al reporte de estudios alentadores en el uso de ITS (inmunoterapia sublingual) en el tratamiento del asma alérgica ocasionada por *Dermatophagoides* decidimos diseñar un estudio doble ciego placebo controlado, pero exclusivamente en población pediátrica mexicana, en rangos de edad menores que los reportados en otros estudios.

Método

Se incluyeron a un total de 33 pacientes de entre tres y 17 años de edad los cuales asistieron al Servicio de Inmunología Clínica y Alergia del Hospital Central Militar del periodo comprendido entre el 1 de octubre del 2000 al 1 de enero del 2001, todos los cuales cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

1. Pacientes con asma alérgica.
2. Asma catalogada como leve persistente o moderada persistente de acuerdo con los criterios establecidos por el National Heart, Lung and Blood Institute.
3. Exclusivamente prueba cutánea positiva a *Dermatophagoides pteronyssimus* o *farinae*.
4. No haber recibido inmunoterapia previa por cualquier vía.
5. No ser portador de alguna inmunodeficiencia o enfermedad maligna.

when a $p = 0.23$ was observed in the group with placebo with a significant difference. The media qualification of symptoms diminished in the group with active drug ($p < 0.001$) and in the group placebo a decrease of ($p = 0.2$), statistically with significant difference.

Conclusions. The sublingual immunotherapy is safe and clinically effective in the reduction of symptoms and use of medications in treatment of allergic asthma for *Dermatophagoides* in selected pediatric patient with persistent mild and moderate asthma. Also, it is better tolerated that the conventional immunotherapy and it favors the attachment to the treatment, key elements in the pediatrics population treatment.

Key words: Sublingual immunotherapy, asthma, dermatophagoides, efficacy.

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Central Militar. La inmunoterapia sublingual fue proporcionada como extractos estandarizados de *Dermatophagoides pteronyssimus* o *farinae* (IPI ASAC de México). A todos los pacientes se les realizaron pruebas cutáneas tomando como positivo la presencia de eritema de más de 3 mm o roncha de más de 5 mm, además se les determinó niveles séricos de IgE total. La forma de administrar la vacuna fue enseñada a los padres o tutores del paciente, colocando un número determinado de gotas (dependiendo del vial correspondiente) debajo de la lengua del paciente durante dos minutos sin ingerir la vacuna, por las mañanas y en ayuno. Todos los pacientes comenzaron la inmunoterapia con el tratamiento de inicio consistente en la administración de la vacuna más diluida (1:625 del vial más concentrado, vial 0) diariamente durante cuatro semanas pasando al vial siguiente de mayor concentración en cada semana hasta llegar al vial de mayor concentración (vial 4) al final de la cuarta semana, posteriormente los pacientes ingresaron al tratamiento de mantenimiento consistente en la administración del vial 4 (máxima concentración) tres veces a la semana durante dos meses. Al ingresar los pacientes al estudio, una vez firmando la carta de consentimiento informado y cumpliendo con los criterios de inclusión, se les realizó historia clínica completa, pruebas cutáneas con un panel de alérgenos estandarizados, determinación de niveles séricos de IgE, biometría hemática, química sanguínea, pruebas de funcionamiento hepático, telerradiografía de tórax, serie de senos paranasales y electrocardiograma. A cada paciente se le siguió durante un periodo de cuatro meses, recolectando cada semana una hoja de control de síntomas y eventos adversos que llenaba diariamente el paciente, al final del tercer mes se le realizó a cada uno un examen físico completo y se repitieron los estudios de laboratorio. Para valorar la eficacia de la inmunoterapia se utilizó una escala análoga visual de uso de medicamentos, de manera que se determinó la puntuación del paciente con base en el uso de medicamentos al inicio y al terminar el estudio. De la misma manera, se valoró la eficacia con una escala análoga visual de síntomas, determinando la puntuación al inicio y al final del

estudio dependiendo de los síntomas referidos por el paciente. La seguridad de la inmunoterapia se determinó con base en el número de eventos adversos registrados por el paciente a lo largo del estudio así como por los resultados de los estudios de laboratorio al final del tratamiento. Se incluyeron al estudio todos los pacientes de edad pediátrica que asistieran a la consulta externa del Servicio de Inmunología Clínica y Alergia del Hospital Central Militar del periodo comprendido entre el 01 de octubre del 2000 al 01 de enero del 2001, que tuvieran asma alérgica, diagnosticada por un especialista del Servicio, y que presentaran una prueba cutánea positiva exclusivamente a *Dermatophagoides*. Una vez que los padres o tutores firmaran la carta de consentimiento informado para ingresar al estudio, los pacientes fueron asignados de manera aleatoria a un grupo activo o a un grupo placebo, siendo los investigadores y los pacientes ciegos. Con el fin de permitir el diseño doble ciego del estudio, las vacunas fueron proporcionadas etiquetadas con un código, tanto las que contenían el medicamento activo como las que contenían el placebo. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS para Windows. Se determinó el tamaño de la muestra de 29 pacientes con un error alfa de 0.05 y un error beta de 0.20. Para la comparación de los grupos se aplicó la técnica de Wilcoxon para los datos de inicio y final de sintomatología e inicio y final de medicamentos. Para comparar las calificaciones finales de sintomatología y uso de medicamentos entre ambos grupos se aplicó la técnica de Mann-Whitney. Se aplicó también la prueba no paramétrica de χ^2 para la distribución de las frecuencias por sexo en ambos grupos de estudio.

Resultados

Se incluyeron un total de 33 pacientes. Durante el primer mes de tratamiento cuatro pacientes desertaron del estudio por referir sus padres que no observaban mejoría en el paciente, se procedió a determinar a qué grupo pertenecía cada paciente, siendo los cuatro pacientes del grupo placebo, los 29 restantes terminaron el estudio constituyendo 20 pacientes el grupo activo siendo 10 pacientes del sexo masculino y 10 del femenino con un promedio de edad de 7.75 años y nueve pacientes el grupo placebo siendo seis del sexo masculino y tres del femenino con un promedio de edad de 8.31 años (Figura 1 y 2).

Con relación a las calificaciones de sintomatología obtenidas al inicio y final del estudio se encontró una disminución de síntomas en el grupo activo con una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.01$) (Figura 3).

Con respecto al uso de medicamentos en el mismo grupo se encontró una reducción de uso de medicamentos con una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.01$) (Figura 4).

En lo referente a la sintomatología y al uso de medicamentos en el grupo placebo no se encontró una reducción estadísticamente significativa al inicio y al final del tratamiento ($p = 0.203$ y $p = 0.203$). Se compararon los resultados finales de sintomatología y uso de medicamentos entre

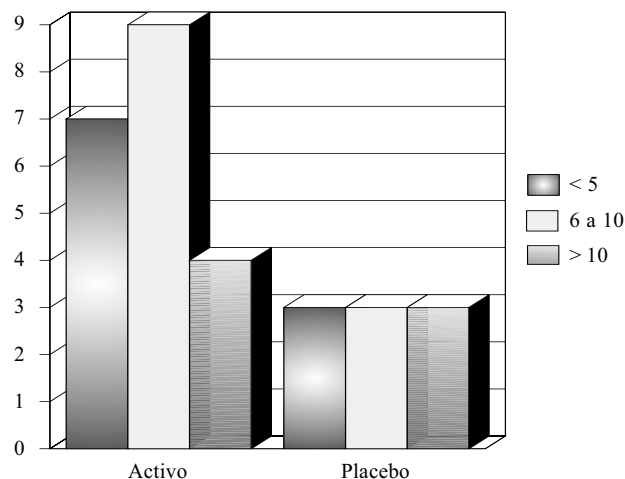


Figura 1. Pacientes pediátricos con asma alérgica leve persistente y moderada persistente tratados con activo y placebo distribuidos por grupos de edad.

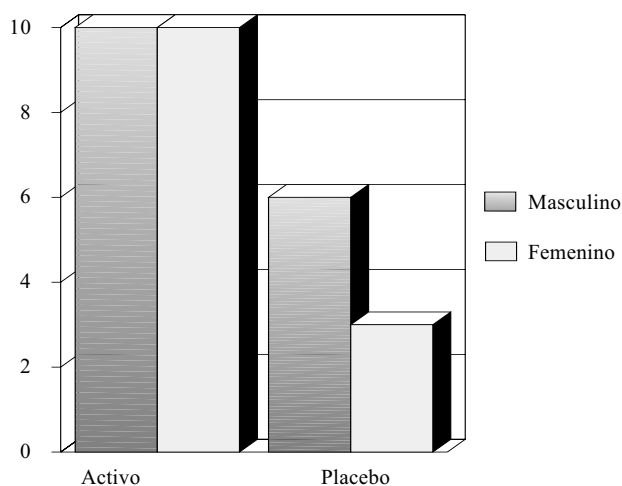


Figura 2. Pacientes pediátricos con asma alérgica leve persistente y moderada persistente tratados con activo y placebo de acuerdo con la distribución por sexo.

el grupo activo y el grupo placebo encontrando una diferencia estadísticamente significativa en ambos ($p = 0.001$ y $p = 0.001$), lo que indica que la sintomatología final y el uso final de medicamentos es menor en el grupo manejado con activo (Figura 5).

Con respecto a los eventos adversos, se presentó prurito oral en un paciente, descrito por él como leve y autolimitado; se presentó dolor epigástrico en un paciente igualmente leve y autolimitado y un paciente refirió edema del labio inferior, el cual no requirió de ningún tratamiento.

Discusión

En este estudio doble ciego placebo controlado, la inmunoterapia sublingual con un extracto estandarizado de *Dermatophagoides* fue efectivo en reducir los síntomas y el uso de medicamentos en pacientes pediátricos seleccionados con

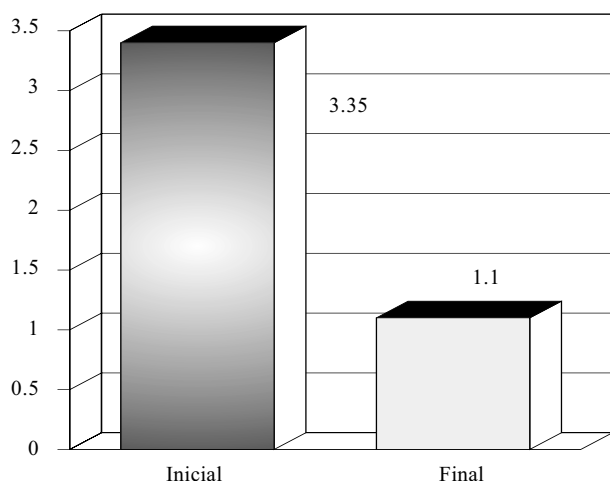


Figura 3. Calificaciones inicial y final de síntomas en grupo de fármaco activo.

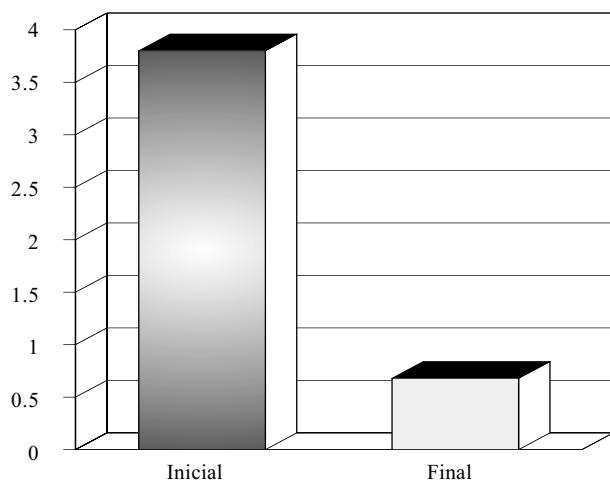


Figura 4. Calificaciones inicial y final de uso de medicamentos en grupo manejado con el fármaco activo.

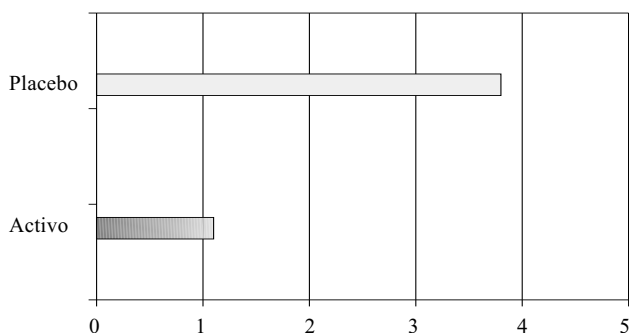


Figura 5. Promedio de calificaciones de sintomatología encontrados en los grupos activo y placebo.

aparecer en revistas científicas sólo a partir de los años ochenta. La evidencia en apoyo de la inmunoterapia sublingual incluye algunos estudios publicados doble ciego placebo controlado y otros muchos estudios controlados disponibles como resúmenes o documentos completos condujeron a la OMS a reconocer esta modalidad de inmunoterapia como una posible opción terapéutica. La mayoría de los ensayos clínicos han sido conducidos principalmente en adultos y sólo cuatro han sido realizados en pacientes pediátricos, sólo un estudio con ácaros del polvo. En este estudio doble ciego placebo controlado demostramos una mejoría estadísticamente significativa con reducción de síntomas y uso de medicamentos en los pacientes tratados con activo. Desde un punto de vista cuantitativo, el efecto placebo fue limitado a una reducción de alrededor de 30% en contraste con 63% de mejoría en el grupo tratado con activo. En nuestro estudio ningún paciente mostró reacciones sistémicas y las reacciones locales ocurrieron sólo en tres pacientes. Estos hallazgos están de acuerdo con otros estudios publicados. Con base en nuestra experiencia concluimos que la inmunoterapia sublingual es un tratamiento eficaz para disminuir los síntomas en niños con asma alérgica a *Dermatophagoides* leve a moderada persistente así como el uso de medicamentos y consideramos que es un tratamiento seguro y bien tolerado por los pacientes.

Referencias

1. Bartolo V, Garattini S. Evaluación de la eficacia de los fármacos. Investigación y Ciencia 1997; 11: 78-88.
2. Baeza-Bacab MA. Prevalencia del asma en México. En: Sienra M: Alergia e inmunología. México: McGraw-Hill Interamericana; 1997, p. 159.
3. Werk LN, Steinbach S, Adams WG, Bauchner H. Beliefs about diagnosing asthma in young children. Pediatrics 2000; 105 (3 Pt 1): 585-90.
4. Lissauer T, Clayden G. Texto ilustrado de pediatría. México: Harcourt Braco; 1998, p. 163.
5. Beasley R, Grana J, Lai CK, Pearce N. Prevalence and etiology of asthma. J Allergy Clin Immunol 2000; 105(2 Pt 2): 5466-72.
6. Lemanske RF Jr, Busse WW. Asthma. JAMA 1997; 10; 278(22): 1855-73.
7. National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 2. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. Bethesda: US Department of Health and Human Services, Public Health Service NIH Publication. 1997, p. 97-4051.
8. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention NHLBI/WHO Workshop Report. Bethesda: US Department of Health and Human Services. Public Health Service; January NIH Publication 1995, p. 95-3659.
9. Donohue JF, Ohar JA. New combination therapies for asthma. Curr Opin Pulm Med 2001; 7(2): 62-8.
10. Osman LM, McKenzie L, Cairns J, Friend JA, Godden DJ, Legge JS, Douglas JC. Patient weighting of importance of asthma symptoms. Thorax 2001; 56(2): 138-42.
11. Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. N Engl J Med 2001; 1; 344(5): 350-62.
12. Bousquet J, Lockey RF, Malling H-J, editors. WHO Position paper. Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases. Allergy 1998; 53: 1-42.
13. Friei M. New frontiers in immunotherapy. Allergy Asthma Proc 1999; 20(5): 281-8.
14. MacDonald TT. T cell immunity to oral allergens. Curr Opin Immunol 1998; 10(6): 620-7.

15. Umetsu DT, DeKruyff RH. TH1 and TH2 CD4+ cells in human allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100(1): 1-6.
16. Tsitoura DC, Blumenthal RL, Berry G, DaKruyff RH, Umetsu DT. Mechanisms preventing allergen-induced airways hyperactivity: Role of tolerance and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(2): 239-46.
17. Durham SR, Till SJ. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102(2): 157-64.
18. Arlian LG. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(3): 406-13.
19. Wahn U. Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(6 Pt 1): 763-9.
20. Hill DJ. The Melbourne house dust mite study: Eliminating house dust mites in the domestic environment. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(3): 323-9.
21. Nelson HS. The importance of allergens in the development of asthma and the persistence of symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(6 Pt 2): 5628-32.
22. Custovic A. Exposure to house dust mite allergens and the clinical activity of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98(1): 64-72.
23. Platts-Mills TAE, Tovey ER, Mitchell EB, Moszoro H, Nock P, Wilkins SR. Reduction of bronchial hyperactivity during prolonged allergen avoidance. *Lancet* 1982; 2: 675-8.
24. Van der Heide S, do Monchy JG, de Vries K, Bruggink TM, Kauffman HF. Seasonal variation in airway hyperresponsiveness and natural exposure to house dust mite allergens in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93(2): 470-5.
25. Malling H-J, Weeke B. editors. EAACI Immunotherapy Position Paper. *Allergy* 1992; 43 (Suppl 6).
26. Reisman RE, Tronolone MJ. Immunotherapy: Introduction and overview. *Immunol Allergy Clin North Am* 2000; 20(3): 469-78.
27. Tipott J. Allergen immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am* 1999; 19(1): 129-48.
28. Hedlin G, Wille S, Browaldh L, Hildebrand H, Holmgren D, Lindfors A, Nordvall SL, Lowenstein H. Immunotherapy in children with allergic asthma: Effect on bronchial hyperactivity and pharmacotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(4): 609-14.
29. Ledford DK. Efficacy of immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2000; 20(3): 503-25.
30. Weber RW. Immunotherapy with allergens. *JAMA* 1997; 278(22): 1881-7.
31. Adkinson NF Jr, Eggleston PA, Eney D, Goldstein EO, Schubert KC, Bacon JR, Hamilton RG, Weiss ME, Arshad H, Mainart CL, Tonascia J, Wheeler B. A controlled trial of immunotherapy for asthma in allergic children. *N Engl J Med* 1997; 30; 336(5): 324-31.
32. Bernstein JA. Cost-benefit analysis for allergen immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2000; 20(3): 593-607.
33. Ownby DR. The role of immunotherapy in childhood asthma. *Immunol Allergy Clin North Am* 1998; 18(1): 199-209.
34. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. ACP J Club 1995; 123(2): 39.
35. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Immunotherapy in asthma: An update systematic review. *Allergy* 1999; 54(10): 1022-41.
36. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Allergen immunotherapy for asthma. [Systematic Review] *Cochrane Airways Group Cochrane Database of Systematic Reviews*. Issue 1, 2001.
37. Des Roches A, Paradis L, Menardo JL, Bouges S, Dauras JP, Bousquet J. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(4): 450-3.
38. Moss MH, Bush M. Patient selection and administration of aeroallergen vaccines. *Immunol Allergy Clin North Am* 2000; 20(3): 533-52.
39. Greineder DK. Risk management in allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98(6): 330-4.
40. Tankelesley MS, Butler KK, Butler WK, Goetz DW. Local reactions during allergen immunotherapy do not require dose adjustment. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(5): 840-3.
41. Kemp SF. Adverse effects of allergen immunotherapy. Assessment and treatment. *Immunol Allergy Clin North Am* 2000; 20(3): 571-91.
42. Quirino T, Lemoli E, Siciliani E, Parmiani S, Milazzo F. Sublingual versus injective immunotherapy in grass pollen allergic patients: a double blind (double dummy) study. *Clin Exp Allergy* 1996; 26(11): 1253-61.
43. Pradalier A, Basset D, Claudel A, Couturier P, Wessel F, Galvain S, Andre C. Sublingual-swallow immunotherapy (SLIT) with a standardized five-grass-pollen extract (drops and sublingual tablets) versus placebo in seasonal rhinitis. *Allergy* 1999; 54(8): 819-28.
44. Sabbah A, Hassoun S, Le Sellin J, Andre C, Sicard H. A double blind, placebo-controlled trial by the sublingual route of immunotherapy with a standardized grass pollen extract. *Allergy* 1994; 49(5): 309-13.
45. Nelson HS, Oppenheimer J, Vatsia GA, Buchmeier A. A double-blind, placebo-controlled evaluation of sublingual immunotherapy with standardized cat extract. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92(2): 229-36.
46. Mungan D, Misirligil Z, Gürbüz L. Comparison of the efficacy of subcutaneous and sublingual immunotherapy in mite-sensitive patients with rhinitis and asthma-a placebo controlled study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82(5): 485-90.
47. Bousquet J, Scheinmann, Guinépain MT, Sauvaet J, Tonnel AB, et al. Sublingual-swallow immunotherapy (SLIT) in patients with asthma due to house-dust-mites: A double blind, placebo-controlled study. *Allergy* 1999; 54: 249-260.
48. Frew AJ. Sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(3): 441-4.
49. Passalacqua G, Albano M, Riccio AM, Scordamaglia A, Canonica GW. Local nasal immunotherapy: Experimental evidences and general considerations. *Allergy* 1997; 52(Suppl 33): 10-6.
50. Malling H-J, Abreu-Nogueira J, Álvarez-Cuesta, et al. EAACI/ES-PACI Position Paper on Local Immunotherapy. *Allergy* 1998; 53: 933-44.
51. Vourdas D, Syrigou E, Potamianou P, Carat F, Batard T, Andre C, Papageorgiou PS. Double-blind, placebo-controlled evaluation of sublingual immunotherapy with standardized olive pollen extract in pediatric patients with allergic rhinoconjunctivitis and mild asthma due to olive pollen sensitization. *Allergy* 1998; 53(7): 662-72.
52. La Rosa M, Ranno C, Andre C, Carat F, Tosca MA, Canonica GW. Double-blind placebo-controlled evaluation of sublingual swallow immunotherapy with standardized *Parietaria judaica* extract in children with allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(2 Pt 1): 425-32.
53. Di Rienzo V, Puccinelli P, Frati F, Parmiani S. Grass pollen specific sublingual/swallow immunotherapy in children: Open-controlled comparison among different treatment protocols. *Allergol et Immunopathol* 1999; 27: 145-51.
54. Di Rienzo V, Pagani A, Parmiani S, Passalacqua G, Canonica GW. Post-marketing surveillance study on the safety of sublingual immunotherapy in pediatric patients. *Allergy* 1999; 54(10): 1110-3.
55. Hirsch T, Sähn M, Leopold W. Double-blind placebo-controlled study of sublingual immunotherapy with house dust mite extract (D.pt.) in children. *Pediatr Allergy Immunol* 1997; 8(1): 21-7.
56. Pajno GB, Morabito L, Barberio G, Panniani S. Clinical and immunologic effects of long-term sublingual immunotherapy in asthmatic children sensitized to mites: A double-blind, placebo-controlled study. *Allergy* 2000; 55: 842-9.
57. Mejía JM, Fajardo A, Gómez A, Cuevas ML, Hernández DM, et al. El tamaño de muestra: un enfoque práctico en la investigación clínica pediátrica. *Bol Med Hosp Infant Méx* 1995; 52(6): 381-91.