

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**EL LABORATORIO EN LA ALERGIA
E INMUNOLOGIA CLINICA.**

TRABAJO MONOGRAFICO

Sustentante:

MARINA FALCONI DE LA FUENTE

Carrera: Químico Farmacéutico Biólogo

1 9 8 3



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E .

1.-INTRODUCCIÓN.

2.-GENERALIDADES.

2.1.-Terminología usual.

2.2.-Herencia y control genético de las enfermedades atópicas.

2.3.-Componentes del fenómeno alérgico.

2.3.1.-El alérgeno.

2.3.2.-El anticuerpo específico.

2.3.3.-El órgano de choque.

2.4.-Clasificación de las alergias.

2.4.1.-Tipo inmediato.

2.4.2.-Tipo tardío.

2.5.-Variedades clínicas del estado alérgico.

2.5.1.-Fiebre del heno.

2.5.2.-Asma.

2.5.3.-Dermatitis.

2.5.4.-Urticaria y edema angioneurítico.

2.5.5.-Reacción individual a medicamentos.

2.5.6.-Alergia alimenticia.

2.6.-Mecanismos de los fenómenos alérgicos.

2.6.1.-Reacciones de tipo I.

2.6.2.-Reacciones de tipo IV.

3.-ANTECEDENTES CLÍNICOS.

4.-PRUEBAS CUTÁNEAS.

4.1.-Causas de error en las pruebas cutáneas.

- 4.2.-Reacciones indeseables y tratamiento.
- 4.3.-Pruebas cutáneas que dan reacciones de tipo inmediato.
 - 4.3.1.-Dermorreacciones por escarificación.
 - 4.3.2.-Intradermorreacciones.
 - 4.3.3.-Transferencia pasiva.
 - 4.3.4.-Interpretación de las pruebas cutáneas.
- 4.4.-Pruebas en mucosas.
 - 4.4.1.-Mucosa conjuntival.
 - 4.4.2.-Mucosa nasal.
 - 4.4.3.-Mucosa bronquial.
- 4.5.-Pruebas cutáneas que dan reacción tardía.
 - 4.5.1.-Prueba de la tuberculina.
 - 4.5.2.-Pruebas por contacto (parche).
- 4.6.-Las pruebas de eliminación y exposición.

5.-EOSINOFILIA.

- 5.1.-Morfología y fisiología de los eosinófilos.
- 5.2.-Condiciones en que se presenta la eosinofilia.
- 5.3.-Tratamiento de las eosinofilia.
- 5.4.-Búsqueda de eosinófilos.
 - 5.4.1.-Determinación de eosinófilos en la cámara cuantaglóbulos.
 - 5.4.2.-Determinación de eosinófilos en extensiones de sangre.
 - 5.4.3.-Determinación de eosinófilos en moco nasal.
 - 5.4.4.-Significación clínica.

6.-EXTRACTOS ALERGENICOS.

- 6.1.-Sinquímica de los alérgenos.
- 6.2.-Composición antigénica de los alérgenos.

- 6.3.-Inhalantes.
 - 6.3.1.- Alto cenere.
 - 6.3.2.- Álenes.
 - 6.3.3.-Hongos.
 - 6.3.4.-Alergenos epidérmicos (pelos, plumas, caspas, fibras).
- 6.4.-Alergenos ingeribles.
- 6.5.-Inyectantes.
 - 6.5.1.-Medicamentos
 - 6.5.2.-Picadura de insectos.
- 6.6.-Contactantes.
- 6.7.-Consideraciones generales sobre la preparación de extractos alérgicos.
 - 6.7.1.-Tipo de material.
 - 6.7.2.-Maceración o pulverización.
 - 6.7.3.-Desengrasado.
 - 6.7.4.-Extracción.
 - 6.7.5.-Filtración.
 - 6.7.6.-Diálisis.
 - 6.7.7.-Concentración del extracto.
 - 6.7.8.-Esterilización.
 - 6.7.9.-Control microbiológico.
- 6.8.-factores que influyen en la potencia de los extractos.
 - 6.8.1.-Actividad específica.
 - 6.8.2.-Concentración.
- 6.9.-Estandarización de extractos alérgicos.
 - 6.9.1.-Estandarización con unidades Noon.
 - 6.9.2.-Estandarización por dilución.

- 6.9.3.-Esterilización por estimación de nitrógeno.
- 6.10.-Preparación de extractos alérgicos crudos.
 - 6.10.1.-Polvo casero.
 - 6.10.2.-Pólenes.
 - 6.10.3.-Hongos.
 - 6.10.4.-Sustancias epidérmicas e inhalantes diversos.
 - 6.10.5.-Alimentos.
 - 6.10.6.-Venenos de insectos.
 - 6.10.7.-Medicamentos y alérgenos hormonales.

7.-INMUNOGLOBULINA E Y COMPLEMENTO.

7.1.-Inmunoglobulina E.

- 7.1.1.-Propiedades fisicoquímicas e inmunológicas de la IgE.
- 7.1.2.-Niveles de IgE en individuos sanos.
- 7.1.3.-Niveles de IgE en individuos no sanos.
- 7.1.4.-Función de la IgE.
- 7.1.5.-Metabolismo.
- 7.1.6.-Determinación de la IgE.
 - 7.1.6.1.-Pruebas cutáneas. (Titulación cutánea).
 - 7.1.6.2.-Inmunodifusión radial.
 - 7.1.6.3.-PRIST (Paper Immuno sorbent Test).
 - 7.1.6.4.-RAST (Radio Allergo Sorbent Test).

7.2.-Complemento.

- 7.2.1.-Actividad del complemento.
 - 7.2.1.1.-Vía clásica.
 - 7.2.1.2.-Vía alterna.
- 7.2.2.-Control de los mecanismos de reacción del complemento.

7.2.3.-Influencias físicas de la activación del complemento.

7.2.4.-Métodos de cuantificación del complemento.

7.2.4.1.-Ensayos antigénicos e inmunológicos.

7.2.4.2.-Ensayos que miden la actividad funcional del complemento y sus componentes.

7.2.4.3.-Otros métodos.

8.-TERAPIA E HIPERSENSIBILIZACIÓN.

8.1.-Eliminación del agente causal.

8.2.-Mecanismos inmunológicos de la reacción alérgica.

8.2.1.-Acción farmacológica de los mediadores químicos y sus mecanismos de liberación.

8.2.2.-Interferencia de la acción de los mediadores químicos y de su liberación.

8.3.-Interferencia con la reacción antígeno-anticuerpo.

8.3.1.-Inhibición de la reacción antígeno-anticuerpo.

8.3.2.-Eficacia y seguridad de la inmunoterapia.

8.3.3.-Antígenos empleados.

8.3.4.-Dosisificación del tratamiento.

8.3.5.-Tipos de tratamiento hipersensibilizante.

8.4.-Otros antígenos empleados en la inmunoterapia.

8.4.1.-Las vacunas bacterianas.

8.4.2.-Venenos de insectos.

8.4.3.-Agentes inmunoterápicos de acción inespecífica.

9.-NUEVOS METODOS DE INMUNOTERAPIA Y DIAGNOSTICO.

9.1.-Inmunoterapia.

9.1.1.-Adyuvantes y adsorbatos.

9.1.2.-Alergenos modificados que aumentan la producción de IgE.

9.1.3.-Supresión de la producción de anticuerpos IgE.

9.2.-Diagnóstico.

9.2.1.-Inmunoensayos de reciente desarrollo.

9.2.2.-Histamina y desgranulación de basófilos.

10.-ESTUDIO DE LOS POLENES Y HONGOS ATMOSFERICOS.

10.1.-Pólenes.

10.1.1.-Estudio de los pólenes.

10.1.2.-Muestreo de los pólenes.

10.2.3.-Clasificación de los pólenes.

10.2.-Descripción de los principales pólenes hallados en México.

10.2.1.-Pastos.

10.2.2.-Hierbas o malezas.

10.2.3.-Arboles.

10.3.-Los hongos.

10.3.1.-Estudio de los hongos.

10.3.2.-Cultivo de los hongos.

10.3.3.-Examen morfológico de los hongos.

10.3.4.-Muestreo de los hongos del aire.

10.4.-Descripción de los hongos más comúnmente hallados.

11.-BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO 1

"INTRODUCCION"

I N T R O D U C C I O N .

La respuesta inmunológica es un equilibrio entre dos - fuerzas: una de supresión, que conduce a la tolerancia de lo propio, y otra de amplificación que conduce a la inmunidad - contra lo ajeno. Tal respuesta resulta ventajosa cuando se - trata de eliminar toxinas o sustancia celular de un microor- ganismo patógeno. Pero en ocasiones ocurren fallas en los me- canismos de reconocimiento de lo ajeno, acarreado numerosos problemas al individuo. Un grupo bien conocido de tales pro- blemas son las reacciones alérgicas. (38, 213).

La palabra alergia describe un estado alterado de reac- tividad inmunológica a sustancias inocuas a la mayoría de - las personas (que se denominan alérgenos), debido a la pro- ducción de anticuerpos de tipo IgE, llamados también reagi- nas, cuyas propiedades inmunológicas son las responsables de los numerosos trastornos que se manifiestan de acuerdo a di- versos factores como son: la vía de exposición a las sustan- cias alérgicas, la distribución de órganos sensibilizados dentro del cuerpo, como por ejemplo: las vías respiratorias en la fiebre del heno y el asma, el tracto gastrointestinal en las alergias a drogas y alimentos, etc. (180).

El estudio de los fenómenos alérgicos se inició a fina- les del siglo XIX, y su desarrollo recibió un gran estímulo con el descubrimiento del papel de los anticuerpos en las - reacciones inmunes (47, 75, 157).

En 1902, Fichet y Fortier, reportaron experimentos en los que perros inyectados repetidamente con pequeñas dosis de extractos de actinias, presentaban una reacción violenta a la reinyección del mismo extracto al cabo de cierto tiempo; este hecho contrariaba la doctrina pasteuriana de la eficacia de la vacunación, y dejaba claro que los animales no sólo no se hallaban inmunizados, sino sensibilizados. Llamaron anafilaxia a este fenómeno.

En 1903, Arthus demostró que el choque anafiláctico puede ocurrir con sustancias no tóxicas, como el suero de caballo, y que las inyecciones intradérmicas de éste podían determinar una especie de inflamación necrosante, verdadera anafilaxia local (fenómeno de Arthus).

A medida que se extendió el uso de sueros profilácticos contra toxinas bacterianas, se comenzaron a observar síntomas de tipo anafiláctico en las personas que los recibían. Basado en estas observaciones, Von Pirquet introdujo en 1907 el término Alergia, para designar la capacidad de un tejido para reaccionar en forma diferente a la habitual, bajo un estímulo a una sustancia extraña sensibilizante que se denominó Alérgeno.

También Von Pirquet clasificó la reacción a la tuberculina como de tipo alérgico, e instituyó métodos de pruebas cutáneas para reconocer la sensibilización del organismo a diversos alérgenos.

En 1921, Praunitz y Küstner transfirieron la sensibili-

dad de un individuo alérgico a individuos normales por medio de la inyección de suero.

Schultz y Dale habían observado que el músculo liso de un animal sensibilizado, se contraía in vitro cuando se le - adicionaba el antígeno sensibilizante. En 1929, Dale propuso la teoría de que en la reacción anafiláctica (a semejanza de el choque histamínico), la reacción antígeno-anticuerpo originaba la liberación de histamina de los tejidos en que tenía lugar tal reacción.

Esta teoría fué confirmada en 1932 por los trabajos de Barthelsh y Feldeberg, quienes aislaron la histamina de un - perfusado pulmonar, proveniente de un animal sensibilizado y que había sido reestimulado con el antígeno. Estos estudios fueron muy importantes, porque permitieron conocer los depósitos principales de este mediador (células cebadas), así como estudiar las propiedades histaminoliberadores de un sinnúmero de sustancias; además, permitieron estudiar numerosas drogas terapéuticas conocidas ahora como antihistamínicos. - Posteriormente se supo que además de la histamina, también - intervienen en el choque anafiláctico otras sustancias, tales como la serotonina, la sustancia motora lenta (SRS), la heparina, la bradiquinina y otras quininas del plasma.

En 1942, Landsteiner y Chase transferían la hipersensibilidad retardada o celular, mediante células peritoneales de un animal sensibilizado a un animal normal. El cobayo donador, había sido sensibilizado previamente con inyecciones intraperitoneales de estromas de eritrocitos de cobayo, a los

cuales se había ligado eficazmente a los picreilos, y empleando como adyuvante M. tuberculosis emulsificado en parafina, de tal manera que el animal sensibilizado reaccionaba al contacto con el cloruro de picreilo.

Hasta hace dos décadas, toda la información que se tenía acerca de la reagina alérgica había sido obtenida a través de la técnica de transferencia pasiva. Actualmente, gracias a los trabajos de los investigadores suecos Johansson y Berg, y los norteamericanos K. y T. Ishizaka, se ha demostrado que los anticuerpos de tipo IgE constituyen las sustancias reactantes de la alergia (reaginas).

El desarrollo de métodos inmunológicos para el estudio de las alergias y la intensa investigación de la inmunidad han establecido definitivamente el estudio de las enfermedades alérgicas en el campo de la Inmunología, planteando a la vez nuevas preguntas cuyas respuestas se vislumbran ya cercanas gracias a las investigaciones científicas actuales.

Con este trabajo monográfico se pretende, a través de bibliografía actualizada, conjuntar las técnicas de laboratorio que permiten el diagnóstico de las enfermedades alérgicas y su tratamiento, describiendo no sólo la técnica, sino también el fundamento inmunológico y/o bioquímico de cada una de ellas.

CAPITULO 2

"GENERALIDADES"

GENERALIDADES.

2.1.-TERMINOLOGIA USUAL.

Se indica a continuación el significado de algunos términos empleados en las alergias (38, 86, 121).

ALERGIA: término introducido por Von Pirquet, para nombrar la reactividad alterada del huésped a un antígeno. Inicialmente se le emplea como sinónimo de hipersensibilidad, especialmente de hipersensibilidad inmediata, implicando de este modo el daño a tejidos inducido por anticuerpos. Sin embargo, existe una sustancial diferencia entre los términos de alergia e hipersensibilidad. Según los postulados de Deerr la alergia (180):

- a) Es una reacción diferente de la normal.
- b) Es específica.
- c) Deben ser reacciones independientes del efecto farmacológico del agente causal. No se trata de una hipersensibilidad o falta de sensibilidad farmacodinámicamente prevista según la composición química del agente causal. Por ejemplo los barbitúricos causan la sedación de pacientes normales, pero en pacientes hipersensibles al medicamento, la misma dosis causa una sedación más prolongada, mientras que en pacientes alérgicos no se nota este efecto farmacológico sino que tienden a mostrarse como brotes urticarianos, erupciones u otras manifestaciones dérmicas.
- d) Debe existir una reacción antígeno-anticuerpo. En este punto es en el que se basa el desarrollo inmunológico de

la reacción alérgica.

"HIPERSENSIBILIDAD: sensibilidad mayor de la normalmente medida (cambio cuantitativo de la respuesta a una sustancia). Inmunológicamente es un estado del organismo previamente inmunizado, en el que resulta daño tisular de la reacción inmune a una dosis adicional de antígeno. La hipersensibilidad puede ser de tipo inmediata, mediada por anticuerpos, o tardía, mediada por células.

ANAFILAXIA: significa "sin protección" y se aplica a las condiciones inducidas artificialmente y experimentalmente tanto en animales como en el hombre, que depende de reacciones antígeno-anticuerpo bien definidas y que no están influenciadas por predisposición hereditaria.

ATOPIA: significa "fuera de lugar", y son formas clínicas de alergia humana, sin equivalencia en animales inferiores y cuyo desarrollo depende de un factor hereditario.

ALERGENO: sustancia antigénica responsable de la reacción alérgica (ver más amplia definición en 2.3.1).

ATOGENO: alergeno responsable de la reacción alérgica en individuos atópicos.

REAGINA: anticuerpo sensibilizante de la piel, encontrado en individuos alérgicos. Pertenecen a la clase IgE.

ANTICUERPO ANAFILACTICO: anticuerpo encontrado en el suero de reactivos anafilácticos.

DESENSIBILIZACION: en relación con el tratamiento de alergias, este término define el proceso por el que se disminuye o elimina la sensibilidad en pacientes que presentan atopia o anafilaxia atópicas.

2.2.-HERENCIA Y CONTROL GENÉTICO DE LAS ENFERMEDADES ATOPICAS.

Los estudios sobre la herencia de las enfermedades alérgicas han establecido sin duda que existe predisposición hereditaria a atopia.

Wiener, Mieve y Fries, propusieron que la enfermedad alérgica atópica podía transmitirse mediante un simple par de genes alelomorfos, H y h, determinando H la no alergia, y h la alergia. Son posibles tres genotipos diferentes: HH, normal puro; hh, alérgico puro (los síntomas alérgicos en estos individuos pueden comenzar antes de la pubertad); Hh, que puede ser o no alérgico, capaz de transmitir el gen a su descendencia (lo cual acontece en una alta proporción de individuos alérgicos con historia familiar negativa) (28).

El mayor grado de herencia, sea bilateral o unilateral, aumenta la posibilidad de que la descendencia se vuelva sensible, además de que también determina la edad de comienzo de la condición alérgica.

En estudios recientes, Marsh y colaboradores (130, 131), postulan que el control genético de la respuesta alérgica depende de la interacción de una variedad de diferentes controles genéticos. Uno de tales controles puede ser el nivel de producción de IgE, lo cual refleja control genético sobre la expansión clonal de las células productoras de IgE luego de la estimulación antigénica. Otro puede ser un control específico al antígeno y determinado por genes Ir (Inmuno-responsivos) específicos que se hallan ligados al sistema mayor de histocompatibilidad (HLA) pero a su vez, se halla modulada por

genes Ia (Inmun-supresivos) también ligands a HLA. Un factor genético adicional de consideración que se ha estudiado es la existencia de un estado de hiperrespuesta asociado a los locus B6, DMS de HLA y que resultó ser responsable de la excesiva respuesta inmune a antígenos extraños (139).

Los estudios genéticos de la respuesta inmunológica a los alérgenos hasta ahora han arrojado poca luz sobre el mecanismo como se desarrollan estas enfermedades, pero a la larga proporcionarán un mejor entendimiento de la respuesta inmunológica de resistencia a estas enfermedades.

2.3.-COMPONENTES DEL FENOMENO ALERGICO.

En toda manifestación alérgica intervienen tres elementos fundamentales: el antígeno (o alérgeno), el anticuerpo específico (o reagina) y el órgano de choque (o sea, el tejido u órgano asiento de las manifestaciones patológicas, - originadas por la interacción de los dos primeros) (16, 38, 75, 121, 140, 180, 213).

2.3.1.-EL ALERGENO.

Se denomina así a cualquier agente físico, químico o biológico capaz de estimular la formación de anticuerpos mediante lo cual el organismo adquiere sensibilización alérgica. Los alérgenos se clasifican en dos grupos: exógenos y endógenos.

Los primeros, según sea la vía de entrada al organismo se dividen en:

a) Inhalantes: polvo de casa, pólenos, esporas de

hormas, casaca, pelo de animales, sacos de insectos.

b) Ingestantes: alimentos, medicamentos.

c) Inyectantes: medicamentos y la picadura de insectos.

d) Contactantes: medicamentos tópicos, caspa de animales o humanas, cosméticos, tinturas, colorantes, sustancias químicas simples, etc.

Los alérgenos endógenos, como su nombre lo indica, son aquellos que se localizan dentro del mismo organismo, tal como las hormonas (75).

Independientemente de la sensibilidad de la persona alérgica, algunas de estas sustancias poseen mayor capacidad alérgica que otras, como por ejemplo la penicilina, que en la actualidad ocupa el primer lugar como droga alergizante.

En los últimos tiempos, el número de sustancias potencialmente alérgicas ha aumentado considerablemente, debido al continuo descubrimiento y aplicación en la vida humana de compuestos químicos (drogas, cosméticos) y a la contaminación de los alimentos con antibióticos, insecticidas y productos hormonales (75).

2.3.2.-EL ANTICUERPO ESPECIFICO.

Pertenece a la clase de las inmunoglobulinas E y se presenta en una minoría en la sangre del hombre normal. Se le descubrió inicialmente en el suero de pacientes con fiebre del heno, una enfermedad alérgica. Sus propieda-

des fisicoquímicas, inmunológicas y biológicas serán estudiadas posteriormente.

Estos anticuerpos, poseen actividad citófila hacia la membrana de basófilos y mastocitos, sensibilizando a estas células, que al ponerse en contacto con el antígeno específico, causan la ruptura de la membrana celular de dichas células, que se desgranulan liberando sustancias vasoactivas o sus precursores, que son los responsables en gran medida de los efectos de la reacción alérgica (121, 140).

2.3.3.-EL ÓRGANO DE CHOQUE.

Es el tejido u órgano en el que se desarrollan e única o predominantemente, las alteraciones que dan lugar a las manifestaciones clínicas de carácter alérgico. Como se podrá deducir, los síntomas dependerán de los tejidos afectados por la reacción. Puede darse el caso de que una misma persona presente síntomas de - alergia en dos órganos o tejidos, por ejemplo: tejido bronquial (asma) y la piel (dermatitis) y ser provocada por uno o varios alérgenos. Puede darse el caso de que cuando un paciente sea sensible a varios alérgenos, y al mismo tiempo varios sus órganos de choque, ocurra que éstos entren en juego independientemente, por ejemplo: un episodio de rinitis por inhalación de polen, - un cuadro urticariano por ingestión de mariscos o un - ataque de jaqueca por ingestión de huevo (180).

2.4.-CLASIFICACION DE LAS ALERGIAS.

Las reacciones alérgicas se han clasificado en dos grupos: uno, mediado por anticuerpos circulantes incluyen las alergias de tipo inmediato. El otro, en el que no se han podido demostrar anticuerpos, pero que se ha asociado con células linfoides que muestran reactividad alterada hacia los antígenos específicos (células sensibilizadas) son las alergias de tipo retardado. En ambos casos también se refieren al tiempo de aparición o evolución de los síntomas (16, 38, 121, 140).

Como toda respuesta inmunológica, las reacciones alérgicas inmediatas y tardías se hallan mediadas por los linfocitos. Los linfocitos B son productores de inmunoglobulinas E al transformarse en células plasmáticas B_E, y los linfocitos T sensibilizados median las reacciones de tipo tardío reaccionando directamente con el alérgeno específico (75, 180, 213).

La sensibilización activa a varios alérgenos, provocará respuesta de tipo inmediato y tardío en un mismo organismo, y los anticuerpos serán poblaciones heterogéneas, que difieren en su capacidad de fijarse a basófilos y mastocitos, para así iniciar diferentes reacciones alérgicas en especies animales homólogas y heterólogas, ofreciendo la posibilidad de clasificar signos y síntomas patológicos individuales, en reacciones de tipo inmediato o tardío. En ambos tipos de reacciones, la acción del antígeno sobre las células sensibilizadas, lleva a la liberación de mediadores solubles que son los efectores de muchos aspectos de cada respuesta (140).

2.4.1.-REACCIONES ALÉRGICAS DE TIPO INMEDIATO.

Anafilaxia.

Reacción de Arthus.

Enfermedad del suero.

Alergia a pólenes.

Fiebre del heno.

Angioedema.

Algunas alergias gastrointestinales y a drogas.

2.4.2.-REACCIONES ALÉRGICAS DE TIPO TARDÍO.

Sensibilidad tuberculínica.

Sensibilidad al contacto con sustancias químicas.

Hipersensibilidad a bacterias, protozoarios y algunos helmintos.

Algunas alergias a drogas y alimentos.

Las reacciones de tipo inmediato acontecen más frecuentemente que las de tipo tardío, y se caracterizan por aparecer en cuestión de minutos o pocas horas tras el contacto con el alérgeno desencadenante en personas previamente sensibilizadas. En cambio, las reacciones tardías suelen presentarse después de transcurridos varios días e incluso semanas.

2.5.-VARIEDADES CLÍNICAS DEL ESTADO ALÉRGICO.

Mencionamos brevemente las características clínicas de las más comunes enfermedades alérgicas (157, 180, 180):

2.5.1.-FIEBRE DEL HENO.

Es una alergia estacional producida por la inhalación de pólenes de árboles, hierbas o pastos; su aparición depende del tiempo de polinación, desde la primavera hasta el verano para los árboles y pastos, hasta fi-

nas del sistema y principal del cuerpo, para las plantas y malezas. La fiebre del heno no estacional se produce por caspas de animales, polvo casero; la raíz de lirio, componente de muchos productos de belleza, suele causar fiebre de heno no estacional. Las mucosas de las vías respiratorias altas son las principalmente afectadas.

2.5.2.-ASMA.

Esencialmente los mismos antígenos inhalados responsables de la fiebre del heno son los responsables de el asma, además de materiales de encuadernación, paja y sustancias semejantes. Las bacterias de la flora normal bacteriana de las vías respiratorias llegan a causar asma endógena. El órgano de choque es la mucosa y la musculatura bronquial, donde la inflamación de la mucosa de revestimiento y el espasmo muscular obstruyen los bronquios menores, ocasionando dificultad en la respiración. El asma puede ser causado también por alimentos como huevos, leche, trigo o diversos medicamentos. Debe notarse que el asma es un complejo sintomático que no siempre es de causa alérgica.

2.5.3.-DERMATITIS.

La dermatitis de etiología alérgica puede ser ocasionada por el contacto con las sustancias alergénicas o por ingestión del antígeno. Frecuentemente la primera se denomina dermatitis por contacto, enfermedad profesional causada por el contacto continuo con sustancias como barniz, nitrocelulosa, cola y materiales semejar-

tes. El antígeno ingerido tiene la piel como órgano de ataque, provocando eczema o infecciones en lactantes que en el adulto a menudo se denomina neurodermatitis.

2.5.4.-URTICARIA Y EDEMA ANGINNEURITICO.

Cuando la piel es el órgano de choque primario, se produce una inflamación acompañada por edema. La urticaria es el conjunto de pápulas rosadas o blanquecinas, que aparecen y desaparecen repetidamente en períodos cortos y es la lesión más frecuente.

El edema anginneurítico o urticaria gigante, presenta edema más extenso y las lesiones son hinchazones amplias y pálidas que cubre regiones como párpados, labios y genitales. Frecuentemente la urticaria y estas lesiones edematosas se hallan combinadas, casi siempre son ocasionados por alergias a antígenos inyectados o ingeridos, es decir, alimentos y medicamentos.

2.5.5.-REACCION INDIVIDUAL A MEDICAMENTOS.

La sensibilidad alérgica a medicamentos, debe diferenciarse de la sensibilidad por poca tolerancia al medicamento, en cuyo caso es producto de la acción farmacológica del medicamento. Los fármacos frecuentemente implicados son: los derivados barbitúricos, los compuestos a base de ácido salicílico, fenelftaleína, opiáceos, sulfamidas, algunos antibióticos, arsenicales y otros.

Las reacciones más frecuentes son la urticaria o la dermatitis, con menor incidencia de asma bronquial.

2.5.6.-ALERGIA A ALIMENTOS.

Los alérgenos agresores más frecuentes son: la le-

da, la rinitis, las faringitis, las alergias. En el tracto el
órgano es afectado por el tipo I (alergias e irritación). -
Fenómenos como el asma. Además, el tubo gastrointestinal
en su totalidad se afecta directamente con el tracto -
consecuente (80).

2.6.-MECANISMOS DE LOS FENÓMENOS ALÉRGICOS.

Gell y Coombs clasificaron las reacciones de hipersensibilidad en cuatro tipos: las reacciones de tipo I están mediadas por los anticuerpos reagénicos (IgE), en los humanos; las de tipo II son producidas por la reacción de anticuerpos fijados a células que al interaccionar con su antígeno, fijan el complemento con la subsecuente lisis celular. Las reacciones de tipo III se efectúan por la deposición de complejos antígeno-anticuerpo en el sitio de la reacción, ocurriendo entonces la fijación del complemento. Las reacciones de tipo IV, o de hipersensibilidad tardía, representa el grupo de los desórdenes de tipo alérgico causados por la reacción específica de un linfocito T sensibilizado con su antígeno.

A continuación se describen con detalle las reacciones de tipo I (tipo inmediato) y las de tipo IV (tipo tardío), - que son las de interés en los fenómenos alérgicos (54, 121, 157, 213).

2.6.1.-REACCIONES DE TIPO I.

Los anticuerpos de la clase IgE, se forman en respuesta a un estímulo antigénico (los alérgenos) específico. Estos inmunoglobulinas E poseen propiedades ci-

tafilinas hacia eosinófilos y mastocitos, por lo cual se fijan a sus membranas celulares vía su porción Fc. Cuando un antígeno o alérgeno se pone en contacto con una molécula vecina de IgE, fijadas a las células mencionadas, ocurre una secuencia de eventos celulares que culminan en la liberación de sustancias biológicamente activas como son la histamina, la serotonina, el SRS-A o sustancia de reacción lenta en anafilaxia, el ECF-A o factor quimiotáctico de los eosinófilos, el PAF o factor activador plaquetario y prostaglandinas. En este proceso, el AMP cíclico y el GMP cíclico poseen funciones reguladoras o moduladoras. Las sustancias liberadas causan la vasodilatación, incrementan la permeabilidad vascular y aumentan la contracción de los músculos lisos. El efecto depende del sitio y extensión del daño, ocurriendo manifestaciones clínicas como urticarias, angioedema, hipotensión, broncoespasmo, espasmo de la musculatura gastrointestinal, etc. (8, 91, 186, 201).

2.6.2.-REACCIONES DE TIPO IV.

La hipersensibilidad tardía se detecta después de 24 a 72 horas en que ocurre la exposición al antígeno. Está mediada por linfocitos sensibilizados a antígenos específicos. Estas reacciones son una forma inmunológicamente inapropiada de la respuesta mediada por células.

Las sustancias antigénicas que causan reacciones tardías, pueden ser proteínas, polisacáridos, mucopolisacáridos.

oáridas o bacterias. Pueden ser exógenas o endógenas.

Los eventos celulares luego del contacto con el antígeno, son idénticos a los de la respuesta inmune mediada por células.

Como en la respuesta primaria a los anticuerpos, - el desarrollo de una población de linfocitos T específica para un antígeno, depende de la interacción entre macrófago y linfocito T, previo procesamiento del antígeno por el macrófago. Así, el antígeno o fragmento antigénico es presentado al linfocito T por el macrófago en asociación con una molécula específica Ia (una mucoproteína producida durante la respuesta inmune asociada). La interacción del macrófago y el complejo antígeno-Ia con la célula T, ocurre a través de un receptor análogo al receptor de inmunoglobulina ligado al linfocito T y cuya naturaleza es controversial. Luego del contacto con el antígeno, los linfocitos son inducidos a elaborar una serie de mediadores, las linfoquinas, cuyo efecto no sólo es sobre los propios linfocitos T, sino sobre otras células que actúan en las reacciones inflamatorias como son: el MIF o factor de inhibición de la migración de macrófagos, el MAF o factor activador de macrófagos, el MF o factor mitogénico, el BF o factor blastogénico, el CF o factor quimiotáctica, el IF o interferón, la LT o linfotoxina, etc.

Las reacciones de hipersensibilidad tardía causan en su mayoría daño tisular en ciertas infecciones, como

cialmente las causadas por micobacterias. La necrosis caseosa y la cavitación pulmonar observada en la tuberculosis, no se debe al microorganismo propiamente dicho, sino a la respuesta del huésped a la micobacteria, respuesta de tipo tardío. Estas reacciones también se hallan implicadas en enfermedades autoinmunes órgano-específicas, en dermatitis por contacto y en tumores (157, 213).

CAPITULO 3

"ANTECEDENTES CLINICOS"

ANTECEDENTES CLINICOS .

Aunque esta parte concierne al médico especialista, conviene de gran interés mencionarla, ya que los datos de los estudios de laboratorio complementan la historia clínica del paciente.

Desde el punto de vista médico, la solución de un problema de alergia, parte esencialmente de los datos de un interrogatorio y de la exploración física (180).

Un especialista en alergias, no basa un tratamiento sólo en los resultados de las pruebas cutáneas, ya que los resultados falsos positivos o negativos, la técnica errónea, la aplicación impropia del alérgeno, los errores de interpretación y la falta de estandarización de los alérgenos, son algunos de los factores que pueden minimizar el valor de las pruebas cutáneas. La historia clínica practicada al paciente, es importante para el alergista, quien se apoya en ella para dar su diagnóstico. De mucha ayuda es el conocimiento de las estaciones de polinosis de árboles, hierbas y pastos de la localidad en que vive el paciente, datos que pueden conducir al diagnóstico presuntivo de la alergia, si ésta es causada por un aeroalérgeno (147, 157).

La narración que el paciente hace, acerca de las causas precipitantes de sus síntomas alérgicos, conduce con frecuencia a la identificación de los alérgenos causantes de la enfermedad. Así, es posible saber que los síntomas alérgicos aparecen cuando el paciente se expone a determinado polen, polvo, alimento o medicamento.

Es importante también registrar los antecedentes familiares en busca de predisposición hereditaria. Así, mediante preguntas clave se llega no sólo al diagnóstico sindrómico sino asimismo al de el alérgeno causante, y es por ello que este procedimiento de interrogatorio no debe dejarse en manos de secretarias o técnicos, ni debe intentarse sustituirlo con cuestionarios (184).

Debe determinarse el curso de la enfermedad durante la vida del paciente: edad de comienzo, localización geográfica del paciente a través de su vida, salud durante los años escolares, empleo y la naturaleza del lugar de trabajo, cambio en los síntomas durante la pubertad o preñez, etc. (38).

Es muy importante establecer cuándo el paciente presenta o no los síntomas, ya que las variaciones anuales estacionales son muy significativas en pacientes alérgicos a pólenes, así como es también importante señalar dónde el paciente experimenta o no los síntomas.

Una detallada descripción del hogar del paciente, así como su trabajo y escuela es muy útil, ya que la presencia de animales domésticos, árboles cercanos o un jardín pueden ser la clave de la etiología de la enfermedad (38, 180).

Es útil también la información acerca de una terapia previa (en casos de alergia a medicamentos). Además, los antihistamínicos y aminas simpaticomiméticas pueden alterar la interpretación de las pruebas cutáneas y dar resultados falsos negativos (180).

También deben evaluarse aspectos no inmunológicos que frecuentemente hacen que el paciente alérgico empeore, como

son el humo de tabaco (no siendo fumador el paciente), pinturas, atomizadores del cabello, perfumes, colonias u otros olores fuertes, polución atmosférica, etc. Deben notarse los efectos de infecciones, del clima y hasta conflictos psíquicos en el paciente (140, 180).

La exploración física no sólo es el complemento útil para verificar lo que el interrogatorio ha señalado, sino que también anade al conocimiento del padecimiento principal, el del organismo considerado en conjunto, y por ello no debe omitírsele, bajo pena de fracasos que han de recaer tanto en el diagnóstico de la enfermedad como en el tratamiento, aún si se trata de casos simples, cuyo interrogatorio no parece dejar lugar a dudas. Debe prestársele particular interés a los sitios más comunes de la enfermedad alérgica, como son: la conjuntiva en conjuntivitis, senos nasales en rinitis, bronquios en el asma, piel en eccema atópico, etc. (160, 213).

Teniendo en cuenta el gran número de variables que se deben considerar para la evaluación clínica de las alergias, la historia clínica es parte muy importante, pero no deben descartarse las pruebas rutinarias de laboratorio y las pruebas cutáneas como parte útil en el diagnóstico (140, 180).

Los estudios de laboratorio de mayor utilidad en padecimientos alérgicos son (140, 157, 180, 213):

Biometría hemática: sólo la eosinofilia es significativa en alergias cuando está elevada en un 12 a 20%, aunque esta también puede indicar una infección parasitaria. Más de un 20% de eosinofilia no se presenta ordinariamente en atopias, y debe evaluarse para otros casos en que se presenta -

eosinofilia.

Examen de heces: en pacientes con pronunciada eosinofilia sanguínea, o en urticurias inexplicables, para excluir la posibilidad de parasitosis.

Análisis urinario: para excluir otras enfermedades no alérgicas.

Examen de Rayos X: debe hacerse en pacientes con asma (tórax), y rinitis (senos paranasales).

Examen citológico de secreciones: para la búsqueda de eosinófilos. Se realiza en secreción nasal principalmente, en esputo, y también puede solicitarse de moco intestinal, secreción conjuntival, y en algunos casos, en exudados pleurales y pericárdicos (casos de alergia cardiovascular).

La evaluación cuantitativa de la función respiratoria puede ser de gran valor, ya que puede señalarse el tipo y severidad de el defecto funcional en asmáticos, además de que pueden notarse cambios inducidos por el tratamiento administrado al paciente.

La determinación de la IgE sérica, se realiza con el objeto de confirmar el aspecto inmunológico de la alergia, y se puede determinar no sólo mediante pruebas cutáneas o traferencia pasiva, sino también cuantificarse, ya sea mediante titulación intradérmica, técnicas 'in vitro' como el RAST (ensayo radicalergoabsorbente) y otros radioinmunoensayos, como se verá en los próximos capítulos.

CAPITULO 4

" PRUEBAS CUTANEAS "

P R U E B A S C U T Á N E A S .

Son de gran valor para el alergista por la información que proporcionan, ya que establecen una base objetiva en la historia clínica. Así se logra confirmar la sensibilización al alergeno sospechado, o bien se llega al hallazgo del alergeno o alergenos responsables, sobre todo en los casos en que los datos de la historia clínica son vagos e inciertos; bajo estas circunstancias, el diagnóstico etiológico depende rá en gran medida de los resultados de las pruebas cutáneas (120, 157, 180, 213).

Existe una amplia variedad de extractos alergénicos a probar en los pacientes alérgicos: Polvo de casa (61), pólenes (183), hongos, alimentos (2, 10), venenos de insectos (82), etc., pero no es necesario probar en el paciente todos los alergenos conocidos. La elección de los alergenos a probar en el paciente, debe basarse en los datos que aportan la historia clínica y en la naturaleza de la condición actual de el paciente. Por ejemplo: pacientes con fiebre del heno estacional, sólo requerirán pruebas con pólenes alergénicos; un paciente con asma, se somete a pruebas con alergenos presentes en el ambiente y en la dieta del individuo, etc. También es de considerarse la edad del paciente, ya que los niños pequeños, por ejemplo, tienen una dieta limitada a un cierto número de alimentos y su ambiente reducido al hogar o a veces a la escuela, lo que limita el número de sustancias

alergénicas a las que se halla expuesto.

La mayoría de las pruebas cutáneas dependen de la producción de una reacción alérgica mediante la exposición intencional del sujeto a el alérgeno en cantidad mínima. El órgano de prueba puede ser además de la piel, la conjuntiva, la mucosa nasal y bronquial, pero debido a que la piel es fácilmente accesible y observable, este casi siempre es el sitio de elección para las pruebas. El tipo de respuesta variará según se trate de reacciones de tipo inmediato o tardío.

4.1.-CAUSAS DE ERROR EN LAS PRUEBAS CUTANEAS.

Pueden darse casos tanto de interpretaciones falsas positivas y falsas negativas. Esto puede ocurrir debido a causas diversas, como el dermatografismo del paciente, en el que el simple estímulo mecánico da lugar a la formación de una pápula y eritema. Extractos alérgicos caducos o incorrectamente elaborados, pueden disminuir su potencia y dar pruebas falsas negativas, y si contienen irritantes inespecíficos o no son fisiológicos respecto al pH y osmolalidad, pueden causar pruebas falsas positivas. La introducción de un volumen excesivo puede causar la irritación mecánica de la piel, que se interpreta como positiva (78).

Los antihistamínicos, la epinefrina, la efedrina, aminofilina y otras aminas simpaticomiméticas pueden interferir con los resultados de las pruebas cutáneas dando resultados falsos positivos (86). Los corticosteroides no afectan las

reacciones de tipo inmediato. La piel de los niños pequeños y de personas mayores pueden dar reacciones de sensibilidad no observables en niños mayores o adultos de sensibilidad comparable.

4.2.-REACCIONES INDESEABLES Y TRATAMIENTO.

En algunos casos ocurre que la prueba cutánea desemboca en reacciones sistémicas o en síntomas de choque anafiláctico (157, 180, 213).

La reacción sistémica, se observa casi siempre por el desarrollo de reacciones locales muy intensas. Algunos minutos luego de la inyección, el paciente siente calor en cara y cuerpo, enrojece, siente prurito en las palmas de las manos o urticaria generalizada. Los síntomas pueden recaer en las vías respiratorias o en una reacción cutánea vascular. Se han reportado casos de sintomatología abdominal.

Los síntomas de la reacción sistémica, pueden existir fugazmente y desaparecer de modo espontáneo, pero puede ocurrir que de no intervenir eficazmente, se intensifiquen y el paciente pase al edema de la glotis, a la disnea intensa y de aquí al estado de choque, con cianosis intensa, colapso e inminente peligro de la vida.

El choque anafiláctico, puede producirse sin que haya reacción sistémica e inclusive, faltando una reacción cutánea positiva, probablemente debido a una rápida difusión y absorción del antígeno. Ha llegado a ocurrir en unos pocos segundos luego de la prueba cutánea y sin dejar lugar a la inter-

vención médica. Empero, esta situación debe considerarse excepcional.

La mayor parte de las reacciones indeseables, pueden evitarse si se ~~tienen~~ precauciones como la conveniente dosificación de los alérgenos, la estrecha observación del paciente al menos 20 minutos luego de la prueba, o más si hay antecedentes; la observación y vigilancia de pruebas positivas intensas que pueden desarrollar reacción sistémica, la atención especial si se utilizan drogas en las pruebas de sensibilidad, etc.

El tratamiento de estas reacciones indeseables, consiste en la aplicación inmediata de adrenalina al 0.001% vía subcutánea. La adrenalina es un antagonista farmacológico de choque rápido y específico. Debe aplicarse sin demora en cuanto aparezcan síntomas, inyectando hacia arriba del sitio en donde se introdujo el alérgeno. Las inyecciones de 1 mg de adrenalina se repiten hasta que se observa visible mejoría del paciente.

4.3.-PRUEBAS CUTANEAS QUE DAN REACCIONES DE TIPO INMEDIATO.

Las reacciones de tipo inmediato, se investigan comúnmente mediante dermorreacciones por escarificación o por intradermorreacciones. Ambas se basan en la producción de una reacción eritematosa inmediata que es característica de la sensibilización alérgica (35, 38, 157, 180, 213).

4.3.1.-DERMORREACCIONES POR ESCARIFICACION.

Tienen la ventaja de la simplicidad por el mínimo

equipo requerido y porque pueden reorganizarse más de 30 pruebas al mismo tiempo, sin causar gran daño al paciente. Son igualmente seguras, porque no ocurre la absorción de alérgeno en cantidad suficiente para producir reacciones indeseables. Su principal desventaja reside en que carecen de gran sensibilidad para la mayoría de los alérgenos, sin embargo, son bastante sensibles para alérgenos inhalables, como los de la fiebre del heno, asma y rinitis. Se prefieren cuando se prueban casos de alergia al suero de caballo u otros animales, en que la hipersensibilidad puede rendir una prueba intradérmica peligrosa.

TECNICA: las pruebas se hacen en la piel de la cara externa del brazo, o en la piel de la cara interna del antebrazo, o bien en la espalda de los niños. La piel se limpia con alcohol y se deja secar. Con una lanceta o escalpelo estéril se realiza una escarificación o rasguño en la epidermis; debe tenerse cuidado de que no sangre. Si se realizan varias pruebas, se hacen todas las escarificaciones a la vez, procurando que queden espaciadas (2 cm entre sí). Una escarificación queda como control negativo. Si el alérgeno es líquido, o pastoso, puede aplicarse directamente a el rasguño y si es polvo, primero se aplica éste y luego un diluyente, que puede ser NaOH al 0.1 Normal. Pueden emplearse extractos alérgénicos en concentración 1:20 peso a volumen. El sitio de control recibe solamente una gota de

diluyente; conviene frotar ligeramente en el sitio de prueba para que se absorba el material alergénico. La reacción puede interpretarse en 15 o 30 minutos.

4.3.2.-INTRADERMOREACCIONES.

Consisten en la inyección intradérmica de una pequeña cantidad de alérgeno. Debido al riesgo de una reacción sistémica, deben emplearse diluciones mayores de alérgenos, generalmente 100 veces menor que la necesaria en las pruebas por escarificación (ver la lista de alérgenos y las diluciones empleadas).

Las pruebas intradérmicas se eligen de la lista de alérgenos probados que dan reacciones negativas o equívocas en las pruebas por escarificación, aunque también es posible realizarlas directamente.

TECNICA: las pruebas en la piel de la cara externa del brazo, o en la espalda, en niños. Es importante que el brazo se halle libre de constricciones como la causada por las mangas apretadas o enrolladas, ya que la obstrucción de la circulación tiende a inhibir o reducir la intensidad de las reacciones. La piel se limpia con alcohol y se deja secar. Mediante una jeringa de tipo tuberculina o insulina estéril, se inyecta una pequeña cantidad del extracto líquido, cuidando que la aguja penetre en la epidermis y no a través de ella. Se inyecta una cantidad de 0.02 ml, aunque en la práctica no es fácil registrar la cantidad exacta, por lo que basta introducir la cantidad suficiente para producir un botón

intradérmico. Este problema se simplifica si se emplea una jeringa dosificadora (31). La inyección de una cantidad excesiva de extracto alérgico, puede dar lugar a reacciones traumáticas inespecíficas o facilitar choques en pacientes muy sensibles. Las reacciones se interpretan en 5 o 10 minutos. No debe olvidarse hacerse un control inyectando diluyente sólo. Las reacciones que se interpreten como débil positivas o dudosas, pueden repetirse ensayando una concentración más alta.

4.3.3.-PRUEBA MEDIANTE TRANSFERENCIA PASIVA.

Esta es una prueba indirecta, descubierta por Praunits y Küstner, y por ello llamada reacción PK. Se basa en que al inyectar intradérmicamente a un individuo no alérgico (o receptor) el suero de una persona alérgica, los anticuerpos reagénicos presentes en el suero inyectado sensibilizan la piel del receptor, que al ponerse en contacto con el antígeno, da una respuesta eritematosa igual que en una prueba intradérmica directa.

Esta prueba se realiza en casos en que la prueba directa es imposible de hacer, como por ejemplo: dermografismo del paciente alérgico, casos de eczemas universales, niños muy pequeños, pacientes asmáticos tratados con adrenalina constantemente, pacientes con gran sensibilidad en los que se teme un choque con la prueba directa.

Es muy importante considerar que el receptor no se

be ser alérgico y que muchas personas normales son refractarias a la sensibilización pasiva; además, debe indicársele no ingerir alimentos o medicamentos que se vayan a probar durante el tiempo que dura la prueba.

TECNICA: se emplea el suero estéril (mediante filtración aséptica en filtros bacteriológicos como Seitz o Millipore) obtenido del paciente alérgico; con este suero se realizan en la piel del receptor (brazo o espalda) columnas de botones intradérmicos empleando una jeringa tipo tuberculina, marcando con un círculo el lugar en que se hizo cada botón. Si se desea es posible inyectar diluciones seriadas de suero, determinándose el título de anticuerpos (título PK) como el recíproco de la más alta dilución de suero que da una reacción positiva.

Luego de 24 a 48 horas, se inyectan 0.02 ml de los extractos alérgicos que se van a probar en los sitios indicados por los círculos, igual que en una prueba directa. La interpretación se hace a los 30 minutos, teniendo en cuenta que las reacciones por transferencia pasiva son generalmente menos intensas que las directas. Un control negativo del suero y del diluyente son necesarios.

4.3.4.-INTERPRETACION DE LAS PRUEBAS CUTANEAS.

La interpretación de las pruebas, se realiza en un tiempo que va de los 10 a 15 minutos, aunque debe recordarse que el tiempo que transcurre para que la respuesta llegue a su máximo, puede ser de unos pocos minutos.

15 minutos o aún más (114, 130). Por ello es recomendable observar al paciente para ver el momento de máxima respuesta, e intervenir en caso de que se presente una reacción indeseable. Las reacciones se registran como sigue:

NEGATIVA (-)

La pápula producida por la inyección intradérmica (o la que limita los bordes de la escarificación) desaparece, no incrementa su tamaño en relación al control y sobre todo, no produce eritema.

DUDOSA (*-)

El eritema es menor de 0.5 cm, o bien se observa una ligera área de enrojecimiento. Se recomienda repetirla con una concentración mayor de alérgeno.

POSITIVA DEBIL (*)

La pápula y el eritema periférico aumentan más de 0.5 cm de diámetro.

MODERADAMENTE POSITIVA (**)

Eritema de 0.5 a 1 cm de diámetro, con areola moderadamente marcada y sin pseudopodia.

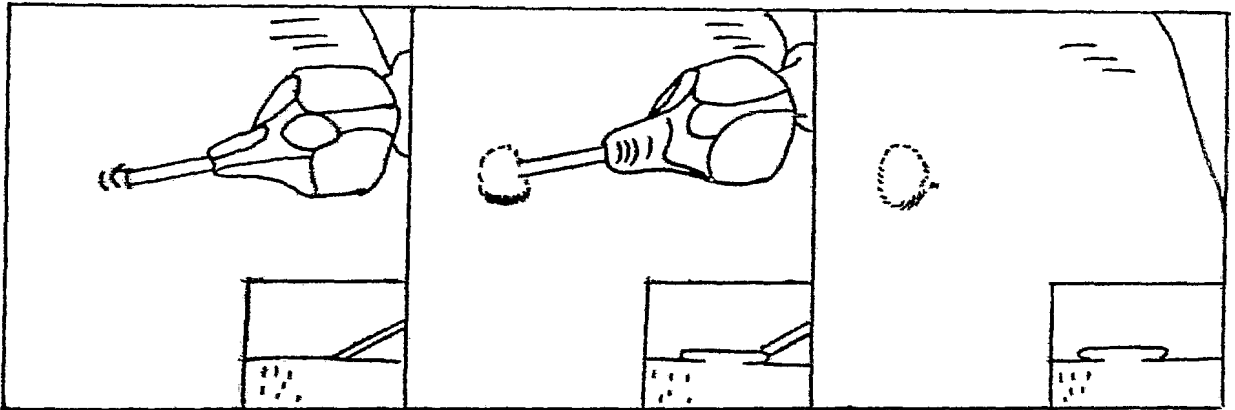
INTENSA (***)

Pápula pronunciada, con pseudopodia y eritema mayor de 1 cm.

MUY INTENSA (****)

Ocurre una exageración en la producción de pápula y eritema invadiendo el área ocupada por otras pruebas.

4.3.3.-PRUEBA CUTANEA INTRADERMICA.



Mediante una jeringa de tipo tuberculina o insulina, se introduce una cantidad de extracto alergénico, suficiente para producir un botón intradérmico (194).

4.3.4.-INTERPRETACION DE LAS PRUEBAS CUTANEAS.

NEGATIVA: (-) sin eritema ni pápula.

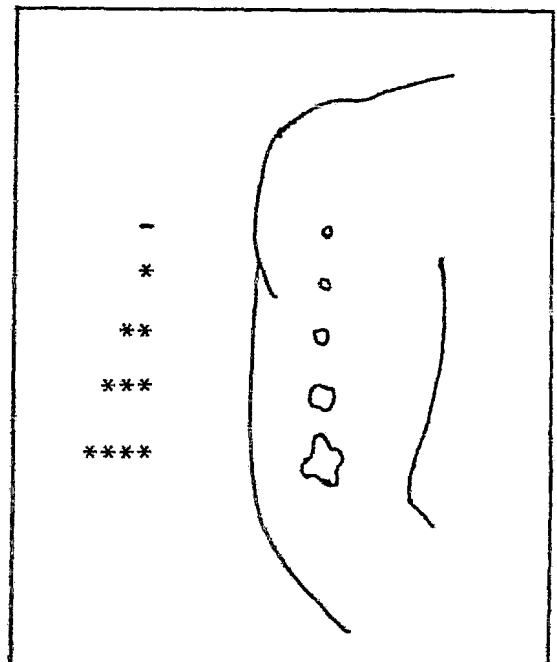
POSITIVA DEBIL: (*) pápula y eritema de 0.5 cm o más.

POSITIVA MODERADA: (**) pápula marcada y eritema de hasta 1 cm.

INTENSA: (***) pápula pronunciada y eritema mayor de 1.0 cm.

MUY INTENSA: (****) exageración de pápula y eritema. -

(194, 224).



3.2.-LISTA DE PLANTAS Y LOS NOMBRES DE LAS ESPECIES
 QUE SE USAN EN LAS RECETAS (1991).

SOLENITS Y HONGOS (10,000 U/ml ó 20,000 U.S.F. ml):

<u>Amaranthus palmerii</u>	<u>Cosmos</u>	
<u>Ambrosia elatias</u>	<u>Capriola dactylon</u>	<u>Ligustrum</u>
<u>Ambrosia trifida</u>	<u>Chenopodium album</u>	<u>Lolium</u>
<u>Artemisa ludovisiana</u>	<u>Quercus</u>	<u>Plantago major</u>
<u>Artemisa tridentata</u>	<u>Fraxinus</u>	<u>Rumex crispus</u>
<u>Artemisa vulgaris</u>	<u>Franseria tenuifolia</u>	<u>Schinus molle</u>
<u>Atriplex bractensa</u>	<u>Helianthus</u>	<u>Salsola pestifer</u>
<u>Populus</u>	<u>Holcus halepensis</u>	

<u>Aspergillus niger</u>	<u>Rucar</u>	<u>Paecylomyces</u>
<u>Aspergillus orizae</u>	<u>Penicillium</u>	
<u>Aspergillus fumigatus</u>	<u>Rizopus</u>	
<u>Alternaria</u>	<u>Absidia</u>	
<u>Candida</u>	<u>Mnnilia</u>	
<u>Hermodendrum</u>	<u>Streptomyces</u>	

OTROS INHALANTES (100-1000 UNP/ml ó dilución 1:10 del extracto concentrado):

Algodón	Lino	Pegol
Conejo (pelos)	Pochote	Piretra
Caballo (pelos)	Plumas de pollo	Ferro (pelos)
Chivo (pelos)	" de ganso	Seda
Ganado (pelos)	" de guajalote	Suero de caballo
"iguierilla	" de pata	Tabaco

4.3.3.-LISTA DE ALIMENTOS DE LOS QUE SE TO MANEJAN
EN LAS FUENTES CONTAMINADAS (1991).

OTROS INHALANTES (Continuación):

Gato (pelos)	Pieles
Lana	Polvo casero

ALIMENTOS BASICOS (Dilución 1:10 del extracto concentrado, a
excepción donde se indica).

Café	Pavo	Té
Caseína (1:100)	Pollo	Avena
Carnero	Puerco	Arroz
Chocolate	Queso	Cebada
Huevo (clara) 1:100	Res	Centeno
Leche (1:100)	Levadura	Maíz
		Trigo

PESCADOS Y MARISCOS (Dilución 1:100 del extracto concentrado).

Almeja	Huachinango	Salmón
Atún	Jaiba	Sardina
Sacalan	Langosta	Trucha
Camarón	Ostión	Cazón
Caviar	Robalo	

FRUTAS (Dilución 1:10 del extracto concentrado).

Aceituna	Mango	Puayaba
Aguacate	Mamey	Melón
Aceituna	Naranja	Mandarina
Ciruela	Piña	Avellana

1977.-LISTA DE MATERIAS PRIMAS DE ORIGEN VEGETAL
 DE LAS ISLAS CAYMANAS (1991).

FRUTAS (Continuación):

Chabacana	Plátano	Almendra
Dátil	Perón	Cacahuete
Durazno	Pera	Coque
Fresa	Sandía	Huez
Higo	Toronja	Pinón
Limón	Lima	Pistache
Uva	Vainilla	Papaya
Manzana	Zapote	

VERDURAS Y ESPECIAS (Dilución 1:10 del extracto concentrado,
 excepto donde se indica).

Apio	Cebolla	Pepino
Ajo	Chicharo (1:100)	Rábano
Alcachofa	Ejote	Tomate
Betabel	Frijol (1:100)	Ajonjolí
Berenjena	Garbanzo (1:100)	Clavo
Camote	Haba (1:100)	Canela
Calabaza	Lechuga	Comino
Calabacita	Lenteja	Chile
Califlor	Nabo	Hoxtaza
Col	Papa	Pimienta

Eliminando las posibilidades de las pruebas falsas positivas o negativas, la interpretación propiamente dicha de los resultados, requiere de una correlación con los datos de la historia clínica y el examen físico.

4.4.-PRUEBAS EN MUCOSAS.

Las mucosas nasal, bronquial y conjuntival, ofrecen una superficie de exposición a alérgenos cuyas reacciones son específicas e indican la sensibilización alérgica (157, 160, - 213).

4.4.1.-MUCOSA CONJUNTIVAL.

Las pruebas oftálmicas, son poco sensibles en comparación con las pruebas intradérmicas y nunca dan reacciones positivas cuando éstas son negativas. Las pruebas oftálmicas se relacionan mejor con la historia clínica que con pruebas cutáneas, ya que pruebas positivas en ambos casos indican un alto grado de hipersensibilidad. Otras desventajas son: el tiempo requerido para realizarlas, el que sólo pueda probarse un solo alérgeno a la vez y la imposibilidad de evaluar reacciones en caso de que exista irritación. Son de interés en pruebas de sensibilización a sueros, previa administración en tratamientos profilácticos, y en prueba a alergia a pólenes.

TECNICA: una o dos gotas de la solución a probar, o bien una pequeña cantidad de polen, se instila en la membrana conjuntival, empleando como control el otro ojo, en el que sólo se agrega el diluyente si la soluc-

ojo probada es un extracto acuoso (generalmente los mismos empleados en las pruebas intradérmicas). También puede emplearse polen de pino, que no es alergénico, como control negativo. El paciente mantiene los ojos cerrados un momento, luego del cual se observa la conjuntiva, siendo positiva la reacción cuando se observa enrojecimiento y lagrimeo. Luego de 20 minutos o menos, en cuanto se observe la reacción positiva, se lava el ojo con solución salina. Las reacciones positivas se alivian con unas gntas de epinefrina al 0.001 %.

4.4.2.-MUCOSA NASAL.

Como las pruebas oftálmicas, son de poco valor, aunque tienen aplicación clínica con ciertas sustancias inhalantes, que dan reacciones intradérmicas dudosas o en pacientes con historia clínica positiva pero pruebas cutáneas negativas. Tienen la misma validez y desventajas de las pruebas conjuntivales.

TECNICA: el alergeno líquido se nebuliza en las fosas nasales; si se trata de un producto seco, se acerca a las fosas nasales del paciente a la vez que lo inhala o bien, se aplica directamente a la mucosa nasal con un hisopo. Una respuesta positiva se manifiesta si el paciente presenta estornudos, prurito y descarga mucosa acuosa, o se le produce tos. Es difícil hacer un control al mismo tiempo, pero sería una práctica reconstruible.

4.4.3.-MUCOSA BRONQUIAL.

Se emplea esta prueba más como herramienta de

investigación clínica y farmacológica. En la rutina, como procedimiento común no es accesible, debido a que requiere mucho tiempo para hacerse y una total cooperación del paciente; la dosis de antígeno empleada no se ha evaluado y la posibilidad de reacciones tardías peligrosas son un riesgo en pacientes ambulatorios.

La prueba se realiza haciendo inhalar los alérgenos en forma de aerosol y la lectura se hace midiendo el tiempo que tarda en reducirse la capacidad vital pulmonar, comparando sus efectos con una solución control apropiada.

TECNICA: la más utilizada, emplea nebulizadores que mantienen una corriente de aire comprimido u oxígeno que hacen fluir el alérgeno nebulizado hacia el árbol bronquial a razón de 6 a 7 litros de gas por minuto. El paciente debe hallarse libre de síntomas como tos o estornudos y no deben administrársele medicamentos como anti-histamínicos y simpaticomiméticos por lo menos 15 horas antes de la prueba.

Se emplean extractos de diferentes concentraciones, comenzando con la más alta concentración de extracto que da una prueba cutánea negativa en una titulación intradérmica, o bien diluciones de 1:10 000 o 1:5 000.

Se nebuliza un volumen de 0.5 a 1.0 ml cada 5 a 10 minutos. La función pulmonar se evalúa de acuerdo a la capacidad vital total, luego de 5, 10, 20 minutos luego de la nebulización de cada dilución de extracto.

4.5.- PRUEBAS CUTÁNEAS QUE DAN REACCIÓN TARDÍA.

Las pruebas de hipersensibilidad tardía (determinada por células T), se efectúan con frecuencia ya que son de gran especificidad y de gran valor diagnóstico. Como siempre, los resultados de las pruebas de hipersensibilidad tardía deben unirse a los datos de la historia clínica y exploración física (73,75, 180, 213).

Los hongos, bacterias, virus, protozoarios y metazoarios son algunas de las causas infecciosas de hipersensibilidad tardía. También sustancias químicas diversas provocan reacciones de este tipo.

Las reacciones tardías a bacterias, aparecen en infecciones por estreptococos, estafilococos, Streptococcus pneumoniae, Salmonella typhi, Brucella, Haemophilus, Bordetella pertussis, Paratuberculosis tularensis, Mycobacteria y muchas otras (73).

También se observan reacciones de hipersensibilidad tardía en infecciones por Chlamydia, como en el linfogranuloma venéreo, psitacosis, tracoma y conjuntivitis por inclusión.

Los virus del sarampión, parotiditis, gripe, herpes simple, viruela, vacuna y otros más, llegan a causar hipersensibilidad tardía.

Las infecciones micóticas causadas por Coccidioides immitis, Blastomyces, Aspergillus niger, Histoplasma capsulatum, Candida albicans, Cryptococcus neoformans y dermatofitos también causan hipersensibilidad tardía (165).

Los metazoarios, como los quistes hidatídicos de Echinococcus granulosus causan hipersensibilidad tardía a el fluido quístico. Lo mismo puede decirse de otras infecciones helmín-

Las infecciones por protozoarios como Leishmania pueden causar hipersensibilidades tardía, especialmente en los casos en que el parásito se aloja en el espacio intracelular.

La picadura de insectos se ha observado con cierta frecuencia como causa de reacciones tardías, pero es de menor importancia que la de tipo inmediato (62).

También ocurren reacciones de hipersensibilidad tardía - cuando el alérgeno entra en contacto con la piel, causando la lesión llamada dermatitis por contacto o dermatitis venenata, siendo los alérgenos sustancias químicas. La dermatitis puede ocurrir por dos mecanismos: a) la sustancia química posee propiedades irritantes naturales y no interviene un proceso inmunológico; b) la sustancia no es irritante, pero contiene sustancias capaces de actuar como antígeno o como hapteno, que provoca una reacción de hipersensibilidad por el contacto prolongado con la sustancia, sobreviniendo la reacción inflamatoria cuyos síntomas pueden ser: prurito, escozor o ardor, máculas eritematosas, pápulas, vesículas, exudación y formación de costras.

Algunos de los alérgenos que dan reacciones por contacto son: los cosméticos que contienen extractos de raíz de lirio, el níquel, el antígeno de Rhus (compuesto fenólico simple que se halla presente en plantas del género Rhus, como el zumaque la hiedra y la ortiga), el cloruro de picroflo, el DNCB (diclorobenceno), sustancias orgánicas simples que actúan como haptenos, medicamentos de aplicación dérmica entre los que se hallan los antihistamínicos, anestésicos y agentes microbio

cidas locales (35).

La alergia de tipo retardado se demuestra mediante la formación de una reacción papulosa tardía (24 a 72 horas), como resultado de la inyección intradérmica del antígeno.

Estos son algunos ejemplos de pruebas diagnósticas que implican inmunidad celular (73):

NOMBRE DE LA PRUEBA	ENFERMEDAD	MATERIAL DE PRUEBA
Prueba de la lepromina	Lepra	Extracto libre de células cutáneas de el paciente leproso.
Prueba del brucelérgeno	Brucelosis	Extracto de nucleoproteínas de <u>Bruce-lla</u> .
Prueba de la histoplasmina	Histoplasmosis	Filtrado del cultivo de <u>Histoplasma capsulatum</u> .
Prueba de la coccidinina	Coccidiodomicosis	Filtrado del cultivo de <u>Coccidioides immitis</u> .
Prueba de Casani	Enfermedad hidatídica.	Líquido cístico de <u>Echinococcus granulosus</u> .
Prueba de Frei	Linfogranuloma venéreo.	Extracto de yema de saco vitelino donde se cultivó LGV.

4.5.1.-LA PRUEBA DE LA TUBERCULINA.

La prueba de la tuberculina es la más común de las pruebas de hipersensibilidad tardía. Se realiza empleando la tuberculina bruta tal como originalmente la empleó Koch, aunque en la actualidad se han hecho muchas adaptaciones siendo la más utilizada la prueba de Mantoux, que consiste en la inyección intradérmica del derivado proteínico purificado de Mycobacterium tuberculosis (PPD). La reacción se evalúa en 48 horas, tiempo en que se considera positiva cuando se observa una zona de induración de 0.5 cm o más de diámetro.

La sensibilidad a la tuberculina, puede ayudar a que los individuos que se han recuperado de una infección por M. tuberculosis resistan otros ataques posteriores o reinfecciones por este agente patógeno. Cuando el bacilo tuberculoso reinfecta a un paciente tuberculino-positivo, el intenso infiltrado celular formado a causa del estímulo al contacto con el bacilo, bloquea el foco de infección antes de que logre establecerse plenamente. Esta misma reacción suele prevenir la presencia de lesiones satélites en sitios cercanos o distantes al foco primario de infección.

La hipersensibilidad a la tuberculina posee valor al contener la infección, pero también representa una posible amenaza para el paciente, ya que la reacción causa la destrucción de tejido; es pues, una espada de doble filo, ya que puede ser útil o nociva en diferentes circunstancias (73).

4.5.2.-LAS PRUEBAS POR CONTACTO.

Se emplean para determinar un agente específico responsable de las reacciones inflamatorias de la dermatitis por contacto. La aplicación directa a la piel del excitante sospechado debe producir luego del contacto, una lesión similar a la que se presenta en la dermatitis (125, 180).

TECNICA: un pequeño cuadro de lino o papel secante, se empapa en la sustancia a probar y se coloca directamente en la piel. Si es polvo, se humedece con solución salina y se pone directamente en la piel. Los materiales sólidos se colocan directamente. Se cubre entonces el cuadro empapado o la unción con un parche adhesivo de 1 o 2 cm², o menos si el paciente siente comezón. Excitantes poco potentes se dejan hasta 48 horas. Una reacción positiva se observa cuando en el sitio de la aplicación existe enrojecimiento y pequeñas vesículas. Una reacción negativa no presenta cambios en el lugar de contacto. El área debe investigarse hasta por 2 semanas antes de considerarse negativa.

La reacción negativa indica sensibilidad, aunque una negativa no necesariamente excluye la presencia de sensibilización.

4.6.-LAS PRUEBAS DE ELIMINACION Y EXPOSICION.

En el diagnóstico de la alergia a alimentos, la historia clínica y familiar es de gran ayuda y muchas veces, la negati -

manera de conocer el alimento causante de las enfermedades alérgicas.

Las pruebas cutáneas pueden realizarse y son útiles cuando la respuesta es de tipo inmediato (2, 10). Si es de tipo tardío, estas pruebas son poco confiables ya que se dan falsos resultados negativos. El mejor modo de probar a qué alimentos se es alérgico es con las dietas de eliminación y exposición (66, 73). Los alimentos causantes del estado alérgico, se van eliminando de la dieta con la consiguiente desaparición de los síntomas. El complejo sintomático, puede entonces ser reproducido reintroduciendo los alimentos causantes de la alergia, probando así la existencia de alergia alimenticia. En base a los datos de la historia clínica, el médico elegirá el tipo de prueba y el alimento o grupo de alimentos a probar.

CAPITULO 5

"EGSINOFILIA"

E O S I N O F I L I A .

Aunque la eosinofilia se presenta en la mayoría de las enfermedades alérgicas, no es indicio específico de sensibilización, ya que la eosinofilia se observa también en numerosas condiciones patológicas. Es por ello que no se le da un gran valor diagnóstico a este dato en los casos de alergia.

Sin embargo, en ausencia de otras condiciones que reporten eosinofilia, no es de despreciarse su valor diagnóstico, ya que su importancia reside en que la presencia de eosinofilia, señale actividad alérgica y verifique el tejido de choque (110), además de que sirve como índice de la efectividad del tratamiento del asma con medicamentos esteroides (40).

Las causas de la eosinofilia no se conocen muy bien y se le relaciona con variaciones en la respuesta a diferentes agentes etiológicos (140, 157).

Se observa aumento de eosinófilos en fenómenos de hipersensibilidad: asma, fiebre del heno, poliarteritis nodosa, dermatitis, alergia medicamentosa (40, 157, 180, 233); en infecciones parasitarias (157), en grado variable en enfermedades como: la enfermedad de Hodgkin, sarcoidosis, tumores malignos, el síndrome de Löeffler, en infecciones micóticas, y otras (85).

La presencia de eosinofilia en enfermedades alérgicas indica la presencia de un fenómeno de hipersensibilidad; en las infecciones parasitarias, se observan manifestaciones clínicas semejantes, lo cual es consistente con la aparición de anticuerpos IgE a constituyentes celulares de los parási-

tos. No se conocen a fondo las causas de las eosinofalias de etiología diferente a las alérgicas y parasitarias.

La eosinofilia se detecta en sangre, y principalmente - en secreciones: nasal, conjuntival, esputo, moco intestinal, y en exudados pleurales y pericárdicos (180).

5.1.-MORFOLOGIA DE LOS EOSINOFILOS.

Miden unas 13 micras de diámetro. Su citoplasma contiene gránulos redondos u ovoides que poseen fuerte afinidad por los colorantes ácidos. Se les reconoce fácilmente por el tamaño y color de sus gránulos, que se tiñen de rojo con colorantes de eosina. Su citoplasma es incoloro o de un tono azul desvanecido. El núcleo es generalmente de dos segmentos y raramente de más de tres. Representan el 3% del total de leucocitos en el adulto sano (7, 85, 157).

Al microscopio electrónico se observan gránulos que contienen cristales incluidos en una matriz densa. En los gránulos inmaduros de mielocitos precursores de eosinófilos no se observan cristales. Los gránulos del eosinófilo contienen peroxidasas, hidrolasas ácidas, fosfolipasas y catepsinas, arilsulfatasas y fosfatasas.

Son producidos en la médula ósea y se localizan también en la piel, pulmones y tracto gastrointestinal, barreras epiteliales al mundo exterior, claro indicio del rol inmunológico de los eosinófilos.

Los eosinófilos son atraídos por factores quimiotácticos, como son algunos producidos por la desgranulación de -

mastocitos y basófilos: el factor quimi-táctico de eosinófilos en anafilaxia (ECF-A), la histamina (8, 107, 108), y otros productos presentes en el plasma, como la kalicreína, algunas proteínas del complemento como C3a y C5a, las linfocinas generadas por linfocitos sensibilizados (37, 198).

Además de los factores quimiotácticos mencionados, existe un mecanismo inmunológico importante, mediado por complejos antígeno-anticuerpo sensibilizante de la piel, que causa la acumulación local de eosinófilos al inyectarlos. (235). Esto no excluye la posibilidad de que otros mecanismos no inmunológicos sean capaces de mediar la eosinofilia.

Los eosinófilos abandonan el torrente circulatorio, cuando se incrementan las hormonas corticoadrenales, proliferan en respuesta a estímulos inmunológicos (proliferación mediada por linfocitos T, en ciertos antígenos), son capaces de fagocitar partículas extrañas como son bacterias, mycoplasmas, levaduras y partículas inertes, pero no tan efectivamente como los neutrófilos. También fagocitan complejos antígeno-anticuerpo, con mayor afinidad hacia complejos antígeno-IgE, pero la fagocitosis no parece ser la principal función de los eosinófilos (35, 97, 157).

Poseen además actividades citotóxicas, actuando como células sensibilizadas asesinas, destruyendo en presencia de anticuerpos, organismos y huevecillos de parásitos como esquistosomas.

En las reacciones alérgicas, los eosinófilos actúan como moduladores, ya que sus gránulos contienen enzimas que

activan los factores liberados en la desgranulación de basófilos y mastocitos, como son: las histaminasas, la arilsulfatasa que inactiva el SRS-A, la fosfolipasa D que inactiva el PAF, una estearasa que parece destruir el ECF-A, y una proteína básica mayor (MBP) que inactiva a la heparina (7).

5.2.-CONDICIONES EN QUE SE PRESENTA LA EOSINOFILIA.

5.2.1.-ENFERMEDADES ALERGICAS.

Es característica la eosinofilia en el asma y rinitis estacional o fiebre del heno. La liberación de mediadores farmacológicos de los mastocitos y basófilos - debido a la interacción de anticuerpos IgE fijados a dichas células con los alérgenos, es la causa de la acumulación de eosinófilos, ya que la histamina, y principalmente el ECF-A, causan la quimiotaxis de eosinófilos. La eosinofilia se encuentra en sangre, médula, esputo y en la descarga nasal y conjuntival (110, 157).

En el asma, la cuenta absoluta de eosinófilos tiene utilidad en el manejo del paciente, porque el nivel de eosinófilos se relaciona directamente al funcionamiento pulmonar, indicando lo adecuado de la terapia con esteroides, además de que puede detectarse la presencia de infecciones complicantes (34).

5.2.2.-DESORDENES DE LA PIEL.

En dermatitis atópica y eczema, frecuentemente se acompaña de eosinofilia sanguínea, especialmente en niños. En pénfigo, la eosinofilia es característica. También se le asocia a reacciones urticarianas (85).

5.2.3.-INFECCIONES PARASITARIAS.

La eosinofilia es más pronunciada si se invaden los tejidos, como en la triquinosis, que si el parásito habita en el lumen de la víscera. Cuando existe continuidad metabólica entre el huésped y el parásito (libre intercambio de fluidos), desaparece la eosinofilia, tal como ocurre en la cisticercosis (85).

5.2.4.-ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

Se observa eosinofilia en varios grados en algunas enfermedades infecciosas, como la fiebre de Scarlat, la corea, la neumonía.

5.2.5.-EOSINOFILIAS PULMONARES.

El síndrome de Löeffler: produce secreción bronquial con eosinófilos, y puede causarlas ciertas drogas, antígenos inhalados o nematelmintos durante su periodo de migración por la sangre a los alveolos pulmonares.

El síndrome de infiltración pulmonar con eosinofilia o PEI: puede ser de etiología bacteriana, viral o micótica, por reacción alérgica a drogas o por infección parasitaria, y se diferencia del síndrome de Löeffler por su severidad.

La eosinofilia pulmonar tropical, se encuentra en individuos de la India, Sudeste Asia y Sudpacífico; presenta niveles séricos de IgE muy altos; la causan microfilarias. No se observa eosinofilia en sangre, pero sí en biopsias de pulmón y nódulos linfáticos (7, 85).

5.2.6.-ENFERMEDADES DE LA SANGRE.

Se observa la hipereosinofilia por largos periodos de tiempo, sin evidencia de causa especifica conocida. - El órgano más afectado es el corazón, y puede presentarse hepatoesplenomegalia. El gran número de eosinófilos circulantes parece ser la causa del daño al corazón, mediante un mecanismo por ahora desconocido (81).

5.2.7.-ENFERMEDADES DE LA SANGRE.

En leucemias mielogénicas crónicas, anemia perniciosa y enfermedades linfoproliferativas se observa hipereosinofilia.

5.2.8.-OTRAS CONDICIONES.

La esplenectomía, neoplasmas, quistes ováricos, la enfermedad de Hodgkin, etc, algunas drogas como la pilocarpina, digitales, ácido para-aminosalicílico, sulfonamidas y otras pueden causar eosinofilia. La eosinofilia hereditaria es rara en ausencia de otras condiciones reconocidas de eosinofilia. (85, 110, 180).

El hallazgo de la llamada "eosinofilia silenciosa" puede alertar al médico a una muy alta probabilidad de que el paciente ha sintetizado SRS-A y está por lo tanto expuesto a una reacción alérgica seria (85).

5.3.-TRATAMIENTO DE LAS EOSINOFILIAS.

La eosinofilia se ha tratado con antibistamínicos, esteroides anabólicos, metotrexato y otras sustancias, pero con resultados inefectivos. En algunos pacientes ha sido efecti

va la ciclofosfarica. La prednisona ha resultado muy efectiva. La hidroxiurea, una sustancia inhibidora de la síntesis de DNA, probó ser un agente muy efectivo. En ciertos pacientes, la hiperensinofilia sindrómica se ha reportado por largos periodos de tiempo, sin daño al mismo, por lo que la terapia no se inicia hasta que el paciente presenta disfunciones orgánicas. La hidroxiurea es la droga de elección cuando el paciente no responde a los corticoesteroides (73).

5.4.-BUSQUEDA DE EOSINOFILOS.

Se observa eosinofilia en sangre: cuando se obtiene 0.35×10^9 eosinófilos/litro o más en cámara cuentaglóbulos, o 0.5×10^9 eosinófilos/litro o más en un conteo diferencial (más del 10%) de leucocitos.

Más del 20% de eosinófilos circulantes, particularmente si el incremento es persistente, requiere una evaluación más acuciosa estudiando biopsias de músculo y piel (caso de poliarteritis), estudios parasitológicos de heces (parasitosis) con la suspensión de todas las drogas que el paciente reciba.

En secreciones nasales, bronquiales y conjuntivales no existen normalmente eosinófilos. Se presentan en los casos anteriormente mencionados y son de gran interés en alergias (73, 85).

5.4.1.DETERMINACION DE EOSINOFILOS EN CAMARA CUENTAGLOBULOS.(46, 47).

El líquido diluyente, sólo debe teñir los gránulos de los eosinófilos de modo brillante, permitiendo que -

...ing... len, causando además la lisis de los glóbulos rojos y otros leucocitos. Existen dos tipos de diluyentes:

- a) Eosina como colorante ácido, acetona como fijador y agua destilada para lisar eritrocitos. La acetona - inhibe la acción lítica del agua sobre los leucocitos, sobre todo en los eosinófilos.

Eosina 1%-----5 ml

Acetona-----5 ml

Agua destilada-----90 ml

Filtrar la mezcla. Puede almacenarse en refrigerador para su uso posterior.

- b) Eosina o floxina como colorante ácido, propilenglicol para lisar eritrocitos, carbonato de sodio como acentuador y heparina para evitar la aglutinación de leucocitos. Su fórmula:

Propilenglicol-----50 ml

Agua destilada-----40 ml

Floxina acuosa 1%-----10 ml

Carbonato de sodio 10%----1 ml

Heparinato sódico-----100 unidades

Filtrar. Puede almacenarse a temperatura ambiente para su uso posterior

Cualquiera de estos dos diluyentes pueden utilizarse en la cámara de Neubauer.

TECNICA: Se emplea sangre con anticoagulante (EDTA).

- a) Aspirar la sangre hasta la marca 1 de la ca-

pipeta Thoma para leucocitos, evitando que se formen burbujas. Limpiar cuidadosamente la boca de la pipeta.

- b) Aspirar el diluyente hasta la marca 11 de la pipeta con sangre (la dilución es 1:10).
- c) Agitar bien y dejar reposar 10 a 15 minutos.
- d) Agitar de nuevo, dejar caer las 1as. gotas de la pipeta Thoma y entonces llenar la cámara de Neubauer del modo usual.
- e) Dejar reposar 3 minutos en cámara húmeda.
- f) Colocar la cámara de Neubauer en el microscopio y contar con el objetivo seco fuerte.

Los eosinófilos se observan como células pequeñas de gránulos rojos brillantes. Se cuentan 2 cámaras.

Cálculos: el número de eosinófilos en 1 mm^3 de sangre es igual al número de células eosinófilas contadas en 2 cámaras. Normal: de 150 a 300 eosinófilos/ mm^3 de sangre. El porcentaje se obtiene de la siguiente manera:

$$\frac{\text{eosinófilos}/\text{mm}^3}{\text{leucocitos totales}/\text{mm}^3} \times 100 = \% \text{ de eosinófilos}$$

La cámara de Fuchs-Rosenthal da mejores resultados debido al mayor volumen de sangre que puede colocarse. Se procede de igual modo que con la cámara de Neubauer, efectuándose se los cálculos necesarios.

5.4.2.-DETERMINACION DE EOSINOFILOS EN EXTENSIONES DE SANGRE.(46, 85).

Se prepara un frotis de sangre y se tiñe con color-

rante de Wright o Giemsa. Se detern la cantidad de eosinófilos contados en 100 a 200 leucocitos. Lo normal es el 3%.

5.4.3.-DETERMINACION DE EOSINOFILOS EN SECRECIONES.(52).

Puede determinarse en secreción nasal, conjuntival y esputo.

La secreción nasal se recoge mediante un hisopo o una jeringa con un tubo de goma seca y estéril, o haciendo que el paciente sopla la nariz sobre un papel secante. El moco así obtenido se extiende sobre un portaobjetos limpio y se deja secar. Se fija durante 3 minutos en metanol o con calor. Coloréese durante 5 minutos con una mezcla fresca del colorante de May-Grünwald y agua destilada en partes iguales. Contracoloréese con solución acuosa de azul de metileno al 1%, lávese con agua destilada y déjese secar en posición horizontal. La evaluación puede ser cuantitativa, determinando la proporción de eosinófilos que se observa en el total de células contadas (incluyendo polimorfonucleares), o cualitativamente, que es más usual:

Negativo	no hay eosinófilos
*	de 1 a 5 eosinófilos por campo.
**	de 6 a 12 " "
***	de 12 a 20 " "
****	más de 20 " "

Puede emplearse una técnica más sencilla desarrollada por Dutton, empleándose dos soluciones colorantes:

Solución 1: Eosina amarilla-----5g
Alcohol de 95% o agua-950 ml

Solución 2: Azul de metileno-----0.3 g
Alcohol de 95%-----30 ml
Agua-----70 ml

TECNICA: La extensión se hace del mismo modo arriba mencionado, y se colorea con la solución 1 durante 30 segundos, se lava con agua, se escurre, se decolora con alcohol-acetona (1:2), se lava con agua, se escurre y se contracolora con la solución 2 durante 10 segundos, se lava con agua y se seca verticalmente. Se hace la evaluación cualitativa como se mencionó antes.

SIGNIFICADO CLINICO: Cuando obtenemos de 10 a 25% de eosinofilia, es indicio de alergia. En el recién nacido, la eosinofilia nasal parece ser normal, desapareciendo a los 3 meses de edad, luego de la cual el examen de la secreción nasal, tiene valor para predecir la aparición de rinitis alérgica o asma en lactantes con eczema atópico. En individuos sanos, no se observa eosinofilia en secreciones (52).

CAPITULO 6

"EXTRACTO ALERGENICOS"

E X T R A C T O S A L E R G E N I C O S .

La correcta obtención de extractos alérgicos es de gran importancia para la realización de las pruebas cutáneas (78) y para la preparación de las vacunas hiposensibilizantes (36), empleadas en el tratamiento de los pacientes alérgicos.

6.1.-BIOQUÍMICA DE LOS ALERGENOS.

Los datos científicos demuestran, que la mayor parte de los alérgenos que se encuentran en la naturaleza son proteínas o glicoproteínas. Sin embargo, sólo una limitada cantidad de las numerosas proteínas que se hallan en los extractos alérgicos, son importantes en las reacciones alérgicas. Algunas proteínas, son las moléculas efectoras principales de las reacciones alérgicas en la mayoría de los pacientes, por lo que se denominan "alérgenos mayores"; además, un extracto puede contener una serie de "alérgenos menores", que sólo son de importancia en muy pocos pacientes. Los extractos alérgicos crudos, contienen la mayoría de los componentes que son posibles responsables de la actividad alérgica, mientras que los extractos purificados, sólo contienen aquellos componentes considerados como los más alérgicos o alérgenos mayores (157).

La antigenicidad de una sustancia, se debe particularmente a los determinantes antigénicos, que son las áreas de la estructura superficial de una proteína, que se combina espe-

interactúan con las partes complementarias de un anticuerpo o con los componentes de membrana de linfocitos inmunocompetentes. Cada molécula de proteína, es un mosaico de diferentes sitios capaces de reaccionar como determinantes antigénicos - en diferentes sistemas inmunológicos (64, 73, 139).

Los determinantes antigénicos de las proteínas, pueden ser de tipo secuencial (dados por la secuencia lineal de aminoácidos en la molécula), o pueden ser conformacionales (resultan de la conformación estérica o arreglo en el espacio de la molécula proteínica). La mayoría de las proteínas interactúan con anticuerpos, gracias a sus determinantes antigénicos de tipo conformacional, aunque también se han demostrado determinantes antigénicos secuenciales en muchos tipos de péptidos y proteínas. Los polisacáridos de alto peso molecular presentes en bacterias, han demostrado actividad antigénica (139).

El desarrollo de una reacción alérgica, depende de el enlace de dos anticuerpos IgE fijados al basófilo o mastocito, con una molécula alérgica; si tal enlace es crítico, la reacción dependerá del número y distribución de los determinantes alérgicos, accesibles en la superficie de la molécula alérgica y no de el tamaño de la misma (1, 139).

6.2.-COMPOSICION ANTIGENICA DE LOS ALERGENOS.

La identificación de los componentes específicos de los alérgenos y la elucidación de sus estructuras moleculares, son de gran ayuda en la comprensión de los mecanismos por

los que ocurre la biosíntesis de IgE y en la comprensión de la genética de las ataxias humanas. De éste modo, los conocimientos adquiridos nos proporcionan valiosas armas, que nos permiten lograr el bloqueo de la síntesis de IgE, sea a nivel de producción (biosíntesis) o a nivel genético, evitándose de este modo el desarrollo de reacciones alérgicas (130, 131).

En seguida se mencionan los alérgenos de tipo inhalante, ingestante, inyectante y contactante que han sido purificados e identificados sus componentes alérgicos más importantes.

6.3.-INHALANTES.

Este tipo de alérgenos son los transportados por el aire y que actúan al entrar en contacto con las membranas nasal y bronquial (vías respiratorias). Entre ellos tenemos: - el polvo casero, polvo de vegetales (cereales), esporas de hongos, pólenes, pelos y epitelios de animales (caspas) y - sustancias volátiles.

6.3.1.-POLVO CASERO.

El polvo casero es una compleja mezcla de componentes derivados del reino vegetal y animal, entre los que podemos mencionar: hongos y sus esporas, fibras de algodón, plumas, lana, queratina animal, artrópodos y ácaros, bacterias y sus productos de descomposición, sustancias de origen vegetal. Los extractos separados de estos componentes son menos potentes que los extractos de polvo casero. Esto permite argumentar que los compo-

Antes mencionados forman en conjunto, un sustrato accarreador de un único alérgeno de polvo casero, aunque también puede decirse que los extractos separados de los componentes, deben su potencial alérgico en gran parte a el contenido de alérgeno de polvo casero que puedan tener (121).

Los extractos crudos de polvo casero, contienen gran cantidad de heteropolisacáridos, proteínas y glicoproteínas, que intrínsecamente son inactivos desde el punto de vista alérgico, pero que debido a reacciones entre los grupos amino libres de las glicoproteínas con grupos lisina-azúcar de los otros componentes del polvo casero (Reacción de tipo Maillard), las glicoproteínas, adquieren sus propiedades de portadoras de la actividad alérgica del polvo casero (60, 129).

Los componentes alérgicos específicos del polvo casero se han identificado en el polvo purificado mediante la precipitación fraccionada del extracto crudo con disolventes orgánicos y sulfato de amonio, (el polvo purificado se conoce comercialmente como polvo Endo o polvo E). Empleando la cromatografía en DEAE se han separado cuatro fracciones activas (las fracciones I, IV, VI y IX) que se hallan compuestas por glicoproteínas.

De gran importancia en el desarrollo de la sensibilización al polvo casero son los microácaros. Hay estudios que indican que existe una dependencia directa entre la incidencia de reacciones al polvo casero y la saturación del material original con ácaros. Se ha con-

firmado que cerca del 90% de los pacientes sensibles al polvo casero, son sensibles al ácaro del polvo y no al polvo de casa en sí. El género de microácaro Dermatophagoides, cuyo alérgeno mayor se denomina AGf1 (48), constituye el 70% de toda la población de ácaros y es por ello la más estudiada. Sin embargo, el empleo de extractos de ácaros en la inmunoterapia, no justifica la sustitución completa del polvo casero por éstos, pero el enriquecimiento del material de extracción con el cultivo de microácaros, tiene gran valor en muchos casos (162, 212, 218).

En los extractos de polvo casero, hay endotoxinas bacterianas que son pirogénicas. Los microorganismos obtenidos de cultivos microbiológicos de polvo casero son: estafilococos no patógenos en su mayor proporción, estreptococos y bacterias gramnegativas; los hongos y micobacterias también se hallan presentes en diversas proporciones. La fuente de microorganismos más común son las fibras de algodón y de otros tipos (129).

La presencia de sustancias activas de grupos sanguíneos en los extractos de polvo casero, se debe a compuestos serológicamente similares que se hallan entre los polisacáridos de las plantas. Esto lleva a la posibilidad de que ocurran reacciones cutáneas positivas en sujetos normales como resultado de reacciones locales a determinantes de grupos sanguíneos, pero aparentemente no hay relación entre el tipo sanguíneo y las pruebas -

cutáneas. Mediante separación electroforética, se han hallado proteínas inmunológicamente idénticas a la albúmina del suero humano en los extractos de pelos de gatos, que también se hallan en el polvo casero.

Las sustancias de origen vegetal, forman una mezcla de glicoproteínas y glicopéptidos muy degradados a los que un 65% de los pacientes sensibles al polvo casero, - presentan reactividad cutánea.

Los detritus de insectos (62) en general contribuyen a la alergenicidad del extracto de polvo casero. - Consisten en escamas y desprendimientos del cuerpo del insecto y secreciones salivales o de los venenos que inyectan. Uno de los más comunes detritus son los de cucarachas.

Las sustancias colorantes de los extractos del polvo casero, son intermedios entre proteínas y glicoproteínas (los más antigénicos en los extractos de polvo casero), lo que presumiblemente puede indicar que un extracto sea más antigénico si es más oscuro, aunque esto no es definitivamente concluyente sobre la potencia del extracto.

Podemos decir en resumen, que el polvo casero include un sistema ecológico complejo, cuya composición - la integran productos orgánicos de origen animal y vegetal, así como componentes inorgánicos y representantes del micromundo.

5.3.2.-ALÉRGICOS EPIDERMICOS Y FIBRAS.

Son las caspas de animales y humanas, desprendimientos epiteliales, pelos, plumas, que causan sintomatología alérgica por sí solos y que además contribuyen a la alergenicidad del polvo casero (59).

En las fibras de algodón envejecidas, los antígenos se desarrollan presumiblemente con el paso del tiempo; son también refugio de bacterias que liberan endotoxinas capaces de causar la liberación de histamina y que además son pirrogénicas, lo cual establece la conveniencia de la purificación de los extractos. Los extractos purificados liberan aminoácidos y carbohidratos bajo hidrólisis ácida, lo cual revela la naturaleza glicoproteínica de los alérgenos del algodón.

Las plumas de aves son, químicamente diferentes a los alérgenos del polvo casero, ya que la actividad alérgica se debe a una mezcla polidispersa de derivados de queratina, solubles y degradados; el 67 al 73% de las personas sensibles al polvo casero, son sensibles a las plumas de diversas aves. La utilización prolongada de objetos de plumas, conduce a la acumulación en ellos de polvo y al enriquecimiento del material de plumas, con microácaros de tipo Dermatophagoides (129).

5.3.3.-POLENES.

Son el grupo de alérgenos responsables en gran parte de la fiebre del heno y el asma, y han sido purificados y estudiados un gran número de ellos, por lo que

se es bastante acerca de la composición química y estructura antigénica de varias de ellas.

El extracto del polen de ambrosia (alérgica) posee de 10 a 15 alérgenos diferentes. Mediante cromatografía y electroforesis se descubrieron los dos alérgenos mayores del polen de ambrosia, el E y el K (111, 209). El antígeno E contiene cerca del 8% de todas las proteínas solubles y posee el 90% de la actividad alérgica del producto nativo. El antígeno K, corresponde al 3% de la proteína total y posee una reactividad muy baja en relación al antígeno E. La ultrapurificación del antígeno E revela que consiste en dos fragmentos, el A y el B, enlazados no covalentemente y fácilmente dissociables, por lo que en los extractos viejos de ambrosia, la presencia se disminuye considerablemente, ya que la recombinación de las cadenas polipeptídicas, no restablece la conformación estérica original. El antígeno E posee 4 isóalérgenos de idéntica actividad inmunológica. Otros alérgenos menores de ambrosia son: Ra3, Ra4, Ra5 y Citocromo C, - de bajo peso molecular y formados por una simple cadena polipeptídica, que no dan reacciones cruzadas con los alérgenos mayores ni entre sí, por lo que son muy fáciles en estudios sobre el control genético de la producción de IgE, por el sistema de histocompatibilidad.

En el polen de centeno, se han diferenciado 4 componentes importantes (grupos I, II, III y IV), obtenidos mediante fraccionamiento cromatográfico y electroforesis.

ca. Cada grupo posee a su vez, de 4 a dos variantes isoalergénicas. El grupo I contiene el 95% de la actividad alergénica del extracto nativo (104, 133).

En el polen de la hierba comúnmente llamada cola de zorro (Phleum pratense) el alergeno mayor que se ha identificado se denomina antígeno D, y también es proteínico (124, 123). Otros pólenes que han sido estudiados son: Plantago lanceolata (9), el plantén, el abedul (17), y el cedro (77), cuyos componentes alergénicos son proteínas que conforman el 46% del total de las proteínas; son resistentes al calor y tratamiento enzimático.

6.3.4.-HONGOS.

La sensibilización a los hongos se desarrolla como resultado de la inhalación continua de sus esporas. Los hongos más comunes que causan sensibilidad son los contaminantes, como Penicillium, Aspergillus, Alternaria, Mucor, Hammondenrum. También los agentes micóticos altamente infecciosos como Coccidioides, Histoplasma, Blastomyces, Cryptococcus, se acompañan de gran sensibilización, aunque casi siempre de tipo tardío (134).

Los mohos, son predominantes como causa de sensibilización de tipo inmediato en la mayoría de las enfermedades. Los alérgenos de hongos, se preparan generalmente como extractos crudos del hongo cultivado en diversos medios, lo que hace que varíen los antígenos presentes en el extracto, según sea el medio de cultivo empleado.

Además, el cultivar los hongos en un medio nutritivo líquido aumenta sus propiedades alergénicas. Los extractos contienen no sólo los alérgenos específicos sino también otros componentes que pueden ser tanto irritantes como tóxicos (50), provenientes del medio de cultivo.

Los extractos alergénicos de Aspergillus (171) contienen dos fracciones: una mezcla rica de proteínas y glicoproteínas y un componente péptido-polisacárido. La más antigénica es la mezcla de proteína y glicoproteína aunque también la mezcla péptido-polisacárido es alérgica. Los componentes proteínicos son ricos en los aminoácidos serina y alanina; los polisacáridos están formados en su mayoría de mannososa, galactosa y glucosa, y son los responsables de la coloración de los extractos. Estos polisacáridos son componentes estructurales de las paredes celulares y tabiques de los hongos (171).

El hongo Alternaria tenuis posee un complejo peptidopolisacárido presente en las esporas del hongo y que posee el 30% de la actividad del extracto crudo (83), lo que pone de manifiesto que también la masa del hongo (micelio) posee propiedades alergénicas (29).

La tricofitina, extracto del hongo Trichophyton mentagrophytes, un dermatofito, está compuesta de glicoproteínas unidas a una estructura integrada hasta por un 10% de péptidos, galactosa y mannososa. Al disociarse la porción hidrocarbonada del alérgeno, las reacciones de tipo inmediato se debilitan notablemente, aunque en

las reacciones tardías, sólo se modifica el grado de manifestación de los infiltrados tisulares (60).

En las levaduras como Candida albicans, se encuentra un alérgeno de gran importancia en el polisacárido presente en la pared celular, constituido en su mayor parte de manosa (60, 165).

6.4.-ALERGENOS INGERIBLES.

Los principales alérgenos ingeribles son los alimentos y los medicamentos orales (63, 137, 178, 214, 221).

Cuando los alimentos atraviesan el tracto gastrointestinal, son descompuestos por las enzimas digestivas del estómago y los intestinos. Las diferentes etapas de la digestión producen partículas de variados tamaños para ser absorbidas. Las partículas de gran tamaño normalmente no son absorbidas, hasta que son degradadas en partículas más pequeñas para así poder atravesar la mucosa intestinal. Las partículas de gran tamaño pueden ser antigénicas debido a su alto peso molecular y es por ello que no deben ser absorbidas.

La mucosa del tracto gastrointestinal, actúa como una pantalla selectora de las partículas que han de ser absorbidas e introducidas a la circulación sistémica. Una parte de este mecanismo de selección, reside en la IgA secretoria (primera línea de defensa en las membranas mucosas), ya que ayuda a prevenir la absorción de productos de tamaño antigénico atrapándolos en la superficie de la mucosa y evitando así su absorción. Se propone que cuando este mecanismo falla y la

producción de IgA secretoria se reprime, ocurre la alergia - alimenticia, como efectivamente se ha comprobado en pacientes alérgicos con bajos niveles de IgA en mucosas (103).

Los órganos digestivos, son capaces de reaccionar a los alérgenos en forma independiente, incluso en los casos cuando el sustrato alérgico se introduce en el organismo por vía parenteral, inhalación o a través de los tegumentos externos(80).

Las proteínas de los alimentos, son las causantes de las reacciones alérgicas a alimentos, tanto de tipo inmediato como de tipo tardío, sobre todo cuando se ingieren sin cocinar o se ingieren alimentos que contienen proteínas termoestables tal como la leche, huevo, pescados y mariscos. En los alimentos de origen vegetal, como las frutas y legumbres puede indicarse como causa de sintomatología alérgica, el alto contenido de materiales resinosos en ellos (ver tabla 5.4).

Hoy en día es difícil citar un producto alimenticio con respecto al cual no se hayan registrado reacciones alérgicas, por lo que sólo citaremos algunos de los más comunes en la alimentación del hombre, cuyos antígenos se han identificado.

6.4.1.-LECHE DE VACA.

La leche contiene proteínas (hasta 3.5%), 3/4 partes de las cuales están constituidas por caseína y un tercio de lactalbúmina y lactoglobulina. Del fraccionamiento de las lactoglobulinas, se obtuvo la lactoglobulina-beta, de elevada actividad alérgica y responsable de la mayoría de las reacciones alérgicas a la leche - (113).

3.4.-COMPOSICIÓN QUÍMICA DE ALIMENTOS E
LOS ALIMENTOS MAS COMUNES (100).

ALIMENTO	AGUA %	PROTEINA %	GRASAS %	CARBOHI- DRATOS % (*)
Carnero	50.0	21.0	28.0
Clara de huevo	86.2	12.3	0.2
Yema de huevo	49.5	15.7	33.3
Pollo	74.9	21.5	2.5
Puerco	50.1	15.7	33.5
Queso (americano)	28.6	23.9	25.9	0.5 (**)
Res	51.3	26.0	22.0
Avena	7.3	16.7	7.3	67.5
Arroz	9.5	7.9	00.4	81.5
Centeno	12.9	6.8	0.9	76.7
Maíz	75.4	3.1	1.1	19.7
Soya	3.0	33.0	16.0	40.5
Papa	78.3	2.2	0.1	18.4
Lenteja	12.0	24.0	0.4	61.7
Bacalao	32.0	15.5	2.4
Almeja	63.4	8.8	1.0	5.2
Camarón	70.8	23.4	2.0	0.2
Cangrejo	77.1	15.6	1.3	1.2
Langosta	79.2	13.4	12.6	0.2
Salmón	64.4	22.0	00.6
Cereza	0.9	1.0	0.0	18.7
Ciruela	79.3	0.9	0.3	18.2

1.4.-DETERMINACION DE ALGUNOS DE
LOS ELEMENTOS MAS COMUNES (110).

ALIMENTO	AGUA %	PROTEINA %	GRASAS %	CARBOHI- DRATOS % (*)
Fresa	90.4	1.0	0.6	7.4
Lima	85.0	1.0	trazas	12.0
Panzana	84.6	0.4	0.50	14.2
Naranja	86.9	0.8	0.2	11.6
Pera	84.4	0.4	0.5	14.1
Taranja	89.0	1.0	trazas	10.3
Uva	83.0	1.0	1.2	14.4
Almendra	4.8	21.0	54.9	17.3
Cacañuate	9.20	25.8	38.6	24.4
Cañon	14.1	5.7	50.6	27.9

(*) Incluidas las fibras.

(**) Como ácido láctico.

6.4.2.-HUEVOS DE GALLINA.

La clara de huevo, posee diversos componentes proteínicos que de acuerdo con la disminución en potencia alérgica son: lisosima, ovomucina, ovoalbúmina y ovomucoide. La actividad de los componentes de la clara de huevo es 50 veces mayor que la actividad de los componentes de la yema. Otro factor que aumenta la alergenicidad de las proteínas de la clara de huevo, se relaciona a la conjugación de éstas con azúcares, en reacciones de tipo - Maillard (mencionadas en el polvo casero), aunque este aspecto no ha sido bien estudiado (60).

6.4.3.-PESCADOS.

Las fracciones alérgicas más activas se hallan en los tejidos musculares blancos. Muchos autores consideran que estas fracciones, se relacionan a el grupo de proteínas sarcoplasmáticas. Esta clase de proteínas de los peces, no se encuentra en el tejido de los mamíferos. En el bacalao, el antígeno de mayor alergenicidad se denomina alérgeno M (53) y en la merluza lo es el DS 22, y se obtienen del fraccionamiento de los extractos crudos (60).

6.5.-INYECTANTES.

En este grupo, se incluyen los medicamentos introducidos vía intramuscular o intravenosa y las picaduras de los insectos.

6.5.1.-MEDICAMENTOS.

De las drogas que causan reacciones alérgicas (ya

sean ingeridas o inyectadas), tenemos:

Alcaloides: quinina, opio, belladona, estramonio.

Aceites esenciales y bálsamos: aceite de masera de sándalo, etc.

Metales: mercurio, plomo, níquel, arsénico, hierro.

Halógenos: bromo, yodo.

Otros: alquitrán de hulla, bencol, derivados metilados del bencol como las antipirinas, yodoformo, ácido salicílico, creosota, salol, fenolftaleína, barbituratos, dinitrofenol, sulfonamidas, penicilina (de lo más alergénico en la actualidad) (234).

Debido al carácter no proteínico de estas sustancias, se ha señalado que el mecanismo por el cual ocurren las enfermedades alérgicas se deben a que actúan como haptenos que al combinarse con las proteínas plasmáticas acarreadoras, actúan como alérgenos (178).

6.5.2.-LA PICADURA DE INSECTOS.

Estos causan reacciones alérgicas debido a sus secreciones que son tóxicas o irritantes al hombre (13, - 60, 62, 174).

El veneno de los himenópteros (abejas, avispas y hormigas), tiene una composición compleja: proteínas, lípidos como el estero^l, ácidos orgánicos, sales minerales, histamina hasta en un 1% y una fracción volátil soluble en éter aún no identificada (155, 191, 193).

Los componentes del veneno de abeja son: melitina, que es el alérgeno mayor, seguido por fosfolipasa A₂. -

el resto de los componentes forman el 13 restante y son la apamina, hialuronidasa, lisolecitina y otras sustancias de carácter irritante (193, 194).

El veneno de avispas contiene fosfolipasa e hialuronidasa y el alérgeno mayor identificado como antígeno S (116), de naturaleza proteínica.

Los extractos del insecto completo, causan significativa hipersensibilidad especialmente en apicultores - expuestos al polvo de la colmena (152, 159).

6.6.-CONTACTANTES.

Los alérgenos contactantes son las caspas de animales, medicamentos tópicos, cosméticos, tinturas, colorantes del - cabello, etc. Muchas de ellos han sido estudiados anteriormente.

6.7.-CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA PREPARACION DE EX- - TRACTOS ALERGENICOS.

Los alérgenos de calidad ultrapura, son necesarios para la investigación de los determinantes alérgenos, pero tales extractos son caros para propósitos diagnósticos, clínicos y terapéuticos. Los alérgenos menos sofisticados o extractos crudos, pueden servir muy bien para uso clínico y - diagnóstico, aunque en ciertas circunstancias excepcionales deben purificarse, caracterizarse y cuantificarse respecto a la actividad alérgica .

En la preparación de los extractos alergénicos, deben tomarse en cuenta ciertos principios básicos. Ante todo, el extracto debe contener cantidades suficientes del excitante activo, para obtener reacciones positivas en individuos alérgicos; deben ser elaborados con un mínimo de desnaturalización de los alergenos activos; debe ser estéril y libre de irritantes inespecíficos; debe tener tal fuerza y concentración, que no produzca reacciones inespecíficas en individuos normales o reacciones indeseables en pacientes sensibles (213).

Para obtener extractos alergénicos con las características mencionadas, deben seguirse los siguientes principios básicos: (164):

6.7.1.-TIPO DE MATERIAL.

Los extractos deben prepararse con materiales crudos, limpios, nunca adulterados o procesados, ya que el antígeno que actúa como estimulante de la respuesta alérgica, se halla como tal en la materia bruta (164).

6.7.2.-MACERACION O PULVERIZACION.

Para aumentar la superficie que estará en contacto con la solución extractante y romper membranas celulares, excepción hecha de los pólenes, debido a su naturaleza finamente particulada. Para macerar y pulverizar se utilizan morteros, molinos, molidoras de café, etc.

6.7.3.-DESENGRASADO.

Se eliminan grasas y aceites empleando solventes de grasas como el éter, toluol, cloroformo, benceno, etc. ya que el material de pruebas cutáneas es prácticamente -

insoluble en los solventes de grasas. Las grasas se eliminan para obtener extractos claros y transparentes, además de que las grasas contenidas en el material de extracción no son antigénicas (36).

El desengrasado se realiza sumergiéndolo en el solvente elegido, el material alergénico macerado o pulverizado, agítándolo y luego dejando que se asiente para decantar el solvente, o bien, dejándolo evaporar en un lugar bien ventilado (las grasas quedan adheridas en las paredes del recipiente). El proceso se repite si el material es muy grasoso. El aparato Soxhlet, permite desengrasar empleando poca cantidad de solvente de grasas. Para eliminar materia resinosa puede emplearse tetracloruro de carbono, que posteriormente se elimina empleando acetona, debido a que es tóxico. Debe tenerse especial cuidado en este paso, porque los solventes de grasas son muy volátiles e inflamables.

6.7.4.-EXTRACCIÓN.

El material desengrasado y seco, se pesa y se deja en la solución extractante durante 48 horas o más, en proporción 1:5 o 1:10 (material desengrasado:solución extractante), agitando frecuentemente, a temperatura de refrigeración (6).

Las soluciones extractantes más empleadas son:

a) La solución salina amortiguadora de Evans (55):

Salución 1:	Na Cl -----	50 g
	H_2PO_4 -----	5.63 g
	Na_2HPO_4 -----	5.67 g
	H_2O destilada -----	1000 ml

Solución 2: Fenol al 4%.

Se mezclan una parte de la solución 1 y una parte de la solución 2 y 8 partes de agua destilada. Se emplea para todos los extractos, excepto pólenes y hongos; pH final: 7.0.

b) Solución salina amortiguadora concentrada: es la solución anterior, mezclando partes iguales de las soluciones 1 y 2 sin más dilución. Se emplea para frutas jugosas.

c) Solución alcalina de Coca.

NaCl -----	5.0 g
NaHCO ₃ -----	2.75 g
Fenol -----	4.0 g
H ₂ O destilada -----	1000 ml

Tiene un pH=8.2, y se emplea para extraer pólenes, hongos y polvo casero.

d) Solución de Coca glicerinada: se mezclan partes iguales de glicerina y solución alcalina de Coca. En esta solución los extractos son más estables, pero resultan de dolorosa aplicación.

La solución de Evans, puede esterilizarse en autoclave o por filtración, para emplearse como diluyente de los extractos. La solución de Coca puede modificar su pH con el tiempo debido a la pérdida de CO₂ del bicarbonato de sodio, por lo que se recomienda pasar una corriente de CO₂ antes de usarse; cuando se esteriliza por filtración, una presión positiva de 10 a 20 libras previene la formación de espuma debido al desprendimiento de CO₂.

5.7.5.-FILTRACION.

Para eliminar membranas celulares, fibras o semillas. Puede emplearse papel filtro para filtración rápida, filtración en embudos Büchner empleando vacío, algodón o gasas para filtrar sustancias de consistencia gelatinosa, etc. (164, 208).

5.7.6.-DIALISIS.

Los antígenos responsables de la reacción alérgica son solubles en agua y no son dializables, por lo que pueden purificarse mediante diálisis, empleando una membrana de celofán tipo Visking o Dupont 1200. Este grado de celofán permite retener las proteínas alergénicas, a la vez que se eliminan elementos irritantes inespecíficos, colorantes y electrolitos innecesarios. La diálisis se realiza contra el líquido de extracción hasta que se obtiene un pH neutro (208, 216).

5.7.7.-CONCENTRACION DEL EXTRACTO.

Algunos extractos deben concentrarse para obtener la potencia adecuada para las pruebas y tratamiento. Podemos concentrar por evaporación a través de una membrana de celofán, colocando el tubo de celofán frente a un ventilador eléctrico para aumentar la evaporación, hasta obtener el volumen deseado. También puede concentrarse sumergiendo el tubo de celofán, en un recipiente lleno de silicagel, que posteriormente puede secarse al llenarse saturado de agua, en una estufa (123).

5.7.8.-ESTERILIZACION DE LOS EXTRACTOS.

El calor desnaturaliza la mayoría de los alérgenos

La esterilización mediante la adición de sustancias químicas, es indeseable porque introduce irritantes inespecíficos durante las pruebas cutáneas, interfiriendo en su interpretación. La filtración a través de filtros microbiológicos, permite obtener extractos estériles, activos y no irritantes.

Existen diversos tipos de filtros microbiológicos. El Seitz consiste en un cojincillo de asbestos desechable que se coloca en una copa o embudo metálico; tiene el inconveniente de soltar fibras y en ocasiones imparte alcalinidad al extracto filtrado. El Berkelfeld es un filtro de diatomeas, que puede usarse de nuevo después de su limpieza, pero es frágil. Los filtros de vidrio sinterizado requieren antes de su uso un lavado con ácido concentrado y pueden llegar a taparse. Estos filtros (Seitz, Berkelfeld y de vidrio sinterizado) no son útiles para filtrar cantidades pequeñas de extractos porque adsorben cantidades apreciables del extracto. Los filtros de tipo Millipore, emplean membranas filtrantes desechables, compuestas de ésteres de celulosa u otros materiales poliméricos, muy delgadas y biológicamente inertes y que no adsorben apreciables cantidades de extracto. Por ser de tipo desechable, los filtros Seitz y Millipore son los más empleados para la esterilización de los extractos alérgicos (236, 237).

Cualquiera que sea el sistema de filtración elegido, debe emplearse equipo estéril y conservar su esteril-

lidad durante todo el tiempo de filtración. Para ello, se esteriliza el equipo de filtración, que consiste en el embudo con el filtro empujado, mediante un tapón de hule perforado, a un matraz kitasato cuyo brazo se halla relleno de algodón, para evitar la entrada de contaminantes del aire. Para esterilizar podemos emplear el autoclave (121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos). Para acelerar la filtración, se recomienda emplear la succión mediante una bomba de vacío. Como parte del extracto queda adsorbida en los filtros de asbestós, debe humedecerse el filtro con un poco de solución salina antes de empezar a filtrar, para así reducir la cantidad de extracto adsorbido. Luego que se ha completado la filtración, el extracto esterilizado se transfiere a viales estériles en un cuarto o cámara de esterilidad, para evitar contaminaciones.

6.7.9.-CONTROL MICROBIOLÓGICO.

Para asegurar la esterilidad del extracto envasado, debe hacerse el control microbiológico del extracto, sembrando 0.2 o 0.5 ml del extracto en un medio de cultivo enriquecido, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (por ejemplo: caldo de infusión cerebro-corazón o BHI y caldo de Tinglicolato), incubando a 37°C durante 48 horas o más. Si hay crecimiento bacteriano, el extracto debe esterilizarse de nuevo o bien desecharse. Si el cultivo es negativo, el extracto está listo para su uso en las pruebas cutáneas y en el tratamiento (36, 164, 203).

Los todos los pasos mencionados son necesarios en la preparación de los diversos extractos alergénicos. Por ejemplo, los plenes no son necesarios macerarlos ni dializarlos, ya que sus componentes son de por sí muy puros; y si se obtienen comercialmente tampoco es necesario desengrasarlos. La clara de huevo, puede transferirse directamente a un frasco estéril y diluirse con solución extractante estéril, sin necesidad de otros procedimientos, etc., como veremos en la preparación de los diversos alérgenos (ver 6.10).

6.8.-FACTORES QUE INFLUYEN EN LA POTENCIA DE LOS EXTRACTOS.

La potencia de un extracto alergénico dado, se determina por dos parámetros: la actividad específica y su concentración (129).

6.8.1.-ACTIVIDAD ESPECÍFICA.

La actividad específica absoluta de un alérgeno, puede definirse como el número de grupos determinantes, sean antigénicos o alergénicos o ambos, hallados por un álcula, capaz de interaccionar con un predeterminado número de reagentes específicas bajo condiciones estándares. La actividad relativa específica, puede definirse como la mínima cantidad de sustancia alergénica seca, en un soluble, requerida para una mínima respuesta cutánea específica en pacientes especialmente sensibles (30).

Los determinantes antigénicos y alergénicos, pueden sufrir modificación o destrucción por desnaturalización durante el tiempo de almacenamiento, cambiando así la -

concentración química del alérgeno y su especificidad. Reportes experimentales (4), indican que el almacenamiento de los extractos a temperaturas ambientales, sólo preservan el 80% o menos de la actividad específica de los extractos, mientras que a bajas temperaturas como las del refrigerador (4°C) o menos, conservan el 100% de su actividad específica hasta por un año. Se observa una pequeña baja en la potencia de extractos hechos con soluciones fenólicas, aunque no de consideración. Los extractos alérgenos que contienen glicerina hasta en un 50%, son muy estables durante más tiempo que los que son extractos acuosos. La albúmina sérica humana, posee efectos preservativos que se adicionan a los de la glicerina cuando se emplean juntos, conservando la potencia de los extractos hasta por varios años (149).

6.8.2.-LA CONCENTRACION.

La concentración de un extracto alérgico, debe estar directamente en función del contenido alérgico en la muestra seca, la estabilidad de la proteína en solución, la fuerza iónica, el pH, la temperatura de almacenamiento, la adsorción irreversible, la destrucción enzimática en los extractos no refinados, etc., procesos que ocurren durante el almacenamiento y que se reducen con las bajas temperaturas y los preservativos como la glicerina, como ya se indicó. La complejidad bioquímica de los alérgenos, hace necesaria la estandarización correcta de los extractos alérgicos, para poder inferir resultados uniformes en las pruebas cutáneas (123).

5.9.-ESTANDARIZACIÓN DE EXTRACTOS ALERGENICOS.

La estandarización de los extractos alérgicos para su uso diagnóstico y en la inmunoterapia, es de prioridad en la efectividad y aceptación universal de los resultados que con ellos se obtienen (60, 122, 176, 215).

En la actualidad, el control de calidad de los extractos, depende de la comparación entre pruebas cutáneas hechas con lotes nuevos de extractos y lotes viejos de extractos en pacientes alérgicos con grados reconocidos de sensibilidad cutánea. De este modo, se mantienen la potencia de los extractos a un nivel constante año tras año. Esta estandarización se basa en la potencia biológica del extracto, por lo que todo nuevo método de estandarización se compara con él (215).

Los esfuerzos en la estandarización tienen larga historia. Nonn estandarizó sus extractos empleando una relación peso a volumen antes de la extracción, definiendo una Unidad Nonn como equivalente a 0.001 mg de peso seco de polen extraído. Tal estandarización, peso a volumen es todavía la más empleada en la actualidad; sin embargo, es bien sabido que pesos constantes de diferentes cosechas de polen, varían en el contenido alérgico. Cooke y otros, introdujeron las unidades de Nitrógeno Proteico (UNP) y nitrógeno Total (UNT) para cuantificar los constituyentes activos de los extractos alérgicos, pero como sabemos, no todos los alérgenos son proteínicos (30, 36).

Entre otros métodos biológicos e inmunológicos para estandarizar extractos tóxicos: la titulación intradérmica es

humanos (177, 224), empleando diluciones seriadas del extracto, siendo el punto final de la reacción (y la potencia del extracto), la máxima dilución que produce eritema. La liberación de histamina de leucocitos, es otro método de evaluar la potencia de los extractos; los leucocitos de individuos alérgicos cuando son expuestos a su alérgeno específico, liberan histamina; la potencia del extracto se estima de la cantidad de histamina liberada. El mayor problema con este método es la dificultad de obtener adecuadas cantidades de leucocitos del paciente alérgico. La inmunodifusión radial (RID) sólo se emplea para cuantificar alérgenos altamente purificados, como el Antígeno E de ambrosia. El RAST y la inhibición del RAST (prueba Radio-alérgo-sorbente), también se emplean para estandarizar los extractos. El RAST es una prueba específica, en la que el alérgeno se halla en una fase sólida acarreadora, el cual reacciona con una cantidad específica de IgE en un sistema estándar de prueba. La inhibición del RAST, proporciona una mejor cuantificación de los componentes alérgénicos de un extracto; consiste en el empleo de extractos alérgénicos estandarizados en una fase insoluble y de el alérgeno en fase soluble, por lo que compiten por la IgE en concentración conocida que se añade al sistema. Como se hacen diluciones seriadas del alérgeno cuya concentración se desea conocer, la cantidad de IgE ligada a la fase sólida (alérgeno estandarizado), disminuye a mayor cantidad de alérgeno en fase soluble, por lo que la concentración estará dada por la dilución límite que permite detectar IgE ligada a la fase s

... va su la IgE que reacciona con el alérgeno en fase soluble, se elimina mediante lavados (71).

Actualmente la estandarización de los alérgenos purificados es de gran importancia para el tratamiento y el estudio y valoración de la genética de las enfermedades alérgicas.

Los métodos de estandarización más empleados en el laboratorio, se enumeran a continuación. En todos ellos, los extractos se estandarizan en forma concentrada y de ellos, se toman las cantidades necesarias para hacer las diluciones requeridas para las pruebas cutáneas y la inmunoterapia:

6.9.1.-UNIDADES NOON.

Estas unidades, representan la cantidad de extracto obtenido de 0.001 mg de polen seco y desengrasado. Por ejemplo: un extracto de polen 1:10 (1 gramo en 10 ml de solución extractante), contendrá 100 000 Unidades Noon por mililitro de extracto. Así pues, 1 gramo de polen seco y desengrasado contendrá un millón de unidades Noon extractables.

6.9.2.-ESTANDARIZACIÓN POR DILUCIÓN.

Se le emplea mucho para preparar extractos de huevo, suero de caballo, carnes, verduras y frutas, excepción hecha de las semillas. En este caso, el extracto crudo se denomina concentrado - sin dilución y de él, se toman las cantidades necesarias para hacer diluciones de 1:10, 1:100, 1:1000, etc, según se les requiera.

6.9.3.-ESTANDARIZACION POR ESTIPACION DE NITROGENO.

El nitrógeno de proteínas y el nitrógeno total del extracto, se determina por el método de Kjeldahl. Es un método muy seguro para estandarizar extractos alergénicos, aunque no todas las proteínas sean alergénicas. Todo tipo de extractos (pólenes, hongos, alimentos, pelos y caspas, etc.), pueden estandarizarse de este modo.

Una unidad de nitrógeno protéico equivale a - - 0.000 01 mg de nitrógeno protéico por mililitro de extracto, y aproximadamente a 0.000 024 mg de nitrógeno total por mililitro de extracto. Un miligramo de polen equivale aproximadamente a 500 unidades de nitrógeno protéico, o sea, 1 unidad Nonn contiene 0.5 UNP (unidades de nitrógeno protéico) (138, 215).

6.10.-PREPARACION DE EXTRACTOS ALERGENICOS DRUGS.

Se describe a continuación el modo de preparación de diversos extractos alergénicos de acuerdo a las particularidades de cada uno de ellos.

6.10.1.-POLVO CASERO.

Preparación del material: el polvo de casa se colecta (preferiblemente con aspiradora), recogiendo el polvo de alfombras, cortinas, colchones, las orillas de las ventanas y las esquinas de las paredes, que son los sitios en que se acumula el polvo fino responsable de la alergia. Se elimina del polvo las sustancias consideradas no alergénicas como son objetos de plástico y caucho.

lacos, sustancias cercosas o grasas, resacas, semillas, etc. (90). Si el polvo colectado contiene mucha materia gruesa, hay que cernirlo a través de una malla hasta obtener un polvo fino. Se extraen las grasas cubriendo el polvo con éter o tolueno en una habitación bien ventilada o en una campana de extracción; se mezcla bien el polvo con el solvente, se permite que se asiente el polvo y se elimina el éter sobrenadante. La operación se repite hasta 3 veces. El polvo desengrasado se deja secar, quedando listo para la extracción.

Extracción y dializado: la extracción se realiza en solución salina de Evans o en solución de Coca 1:5 (1 parte de polvo en 5 partes de solución extractante), o bien la cantidad de solución extractante suficiente para humedecer y cubrir el polvo. Se extrae durante 72 horas en el refrigerador, con agitación ocasional. Puede añadirse una capa de tolueno sobre el líquido para evitar contaminación microbiana. El extracto se filtra y se dializa contra el líquido de extracción durante 24 horas o más, hasta obtener el $pH=7.0$ (si es necesario, el pH puede ajustarse con $NaOH$ o HCl 1M, según se requiera). Si el extracto dializado se observa claro, conviene concentrarlo.

El extracto dializado se esteriliza por filtración y se envasa, se hace entonces el control microbiológico.

Estandarización: el extracto concentrado obtenido se denomina sin dilución (S.D.) y para las pruebas se

diluye 1:5 o 1:10 o más si así se requiere. En unidades de nitrógeno proteico, el extracto concentrado puede estandarizarse a 10 000 UNP/ml y diluirse para obtener 100 o 1000 UNP/ml para las pruebas cutáneas (123, 180).

6.10.2.-PÓLENES.

Preparación del material: los pólenes pueden obtenerse limpios y desengrasados, secos y bien identificados en algunas casas comerciales acreditadas. En caso contrario, el polen de interés se colecta cuidadosamente, evitando la contaminación con otros tipos de pólenes. Por ejemplo: las flores o hierbas de la misma especie se llevan a una habitación cerrada y libre de corrientes de aire y se colocan en recipientes sobre pliegos de papel limpio, de modo que el polen maduro cae sobre el papel ya sea por gravedad o bien sacudiendo ligeramente los receptáculos polínicos. El polen colectado debe secarse con silicagel, inmediatamente después de colectarse porque la humedad puede causar la hidrólisis de proteínas o de la fracción activa del polen. Se le desengrasa con éter, ya sea por evaporación del solvente, por decantación del mismo o eliminándolo mediante lavados con éter en un embudo Büchner y empleando vacío para mayor rapidez.

Extracción y dializado: la extracción se realiza en solución de Coca o solución de Coca glicerinada, generalmente en proporción 1:5 (peso:volumen), o sea al 20% durante 24 horas en el refrigerador. Puede ser necesario

ario agitar fuertemente para mezclar el polen con la solución extractante. El extracto se filtra y el filtrado se afora al volumen inicial, ya que el polen retiene una cantidad variable de la solución extractante. No es necesario dializar el extracto, ya que algunos de los alérgenos del polen son dializables. Se esteriliza por filtración y se le hace control microbiológico al envasar. (217).

Estandarización: el extracto preparado al 20% contendrá 1 gramo de polen por 5 ml de solución, o sea, - 200 000 Unidades Noon ó 100 000 UNP por mililitro. Para pruebas intradérmicas, la concentración debe ser de 1:100 (10 000 U Noon, aproximadamente 5000 UNP), 1:1000 (1000 U Noon, aproximadamente 500 UNP), o aún más si se trata de una titulación cutánea o de la preparación de vacunas hiposensibilizantes.

6.10.3.-HONGOS.

Preparación del material: los extractos de hongos se preparan a partir del material seco obtenido de el cultivo del hongo en medios sintéticos (60, 165, 180).

El hongo a cultivar puede aislarse del aire, exponiendo cajas de medio Sabouraud sólido durante 10 minutos, o bien, de cultivos obtenidos de las colecciones tipo. Un cultivo puro del hongo deseado, se inocular en el medio líquido de cultivo (Sabouraud, Czapeck) y se incubaba a 25-28°C hasta obtener el máximo crecimiento (4-6 semanas). La etapa óptima de crecimiento es aquella en

que se han formado esporas, que son las principales causas de las reacciones alérgicas, más que el micelio.

Entonces se separa la masa fungal del medio de cultivo y se lava con solución salina normal para eliminar residuos del medio de cultivo, (todos estos pasos deben realizarse con material estéril y cerca de la flama de un mechero, para asegurar que no habrá contaminación con otros microorganismos). El hongo lavado, se inactiva con sucesivos lavados con alcohol (3 o más. Es recomendable dejar en el alcohol los hongos por 24 horas o más). La masa fungal se deseca entonces a 37°C o en un desecador de vacío y se pulveriza en un mortero esterilizado hasta obtener un polvo fino. Para comprobar la inactividad del hongo, se siembra una pequeña cantidad del polvo en un tubo de medio de cultivo y se deja a temperatura ambiente 3 o 5 días. Si llegara a producirse desarrollo, se trata sucesivamente con lavados de acetona y de nuevo se le seca.

Otra técnica consiste en eliminar mediante diálisis los componentes del medio de cultivo, que por sí mismos, o sus metabolitos son alergénicos, empleando un medio de cultivo sintético (165), ya que con el empleo de medios como el Sabouraud, ciertos nutrientes pueden ser adsorbidos sobre el medio en crecimiento, que requieren procedimientos de lavado que pueden disminuir la alergenicidad del extracto. En este caso, el medio indicado se inocular con el cultivo del hongo y se incuba a

25-28°C de 7 a 14 días, dependiendo del hongo, hasta obtener abundante crecimiento del moho. El extracto se prepara del total: masa fungal y licor madre, que se homogenizan en un mezclador y se dejan a 5°C por 48 horas. El homogenado se filtra y el filtrado se dializa contra agua destilada, para eliminar sales no utilizadas y otros ingredientes dializables contenidos en el homogenado. Al el extracto dializado, se añade solución amortiguadora con preservativo (Evans), ajustándose el pH a 6.5 o 7.0, se filtra asépticamente, se hace su control microbiológico y se almacena en refrigeración. Para preparar extractos con glicerina (50%), se añade un volumen igual de glicerina al extracto dializado antes de añadir la solución de Evans. Se filtra asépticamente y se controla su esterilidad.

Extracción y purificación: el hongo pulverizado contenido se extrae en solución de Leca en proporción 1:5 (20%) durante 72 horas. Luego se filtra para separar la materia gruesa y se esteriliza el filtrado, se envasa y se hace su control microbiológico. No se requiere dializar el extracto; puede ser necesario reconstituir el volumen original debido a la absorción de la solución extractante por el hongo.

Estandarización: el extracto al 20% contendrá 1.1 gramos de hongo por mililitro, o sea: 200 000 U Negro - aproximadamente 100000 UNP/ml. Para las pruebas intracéficas se emplean la solución 1:100 ó 10 000 UNP/ml.

3.10.4.-SUSTANCIAS FLORESCIDAS E INHALANTES DIVERSOS.

Preparación del material: las plumas de aves se reogen sin lavar y sin esterilizar, (de preferencia se toman plumas viejas, que son una mejor fuente de alergen^{os}). Los pelos de animales (perro, gato, conejo, etc.) se obtienen cepillando o rasurando al animal. La mejor fuente de alergen^{os}, es el material tipo caspa obtenido de los animales al restregarlos; también se usan sin lavar ni esterilizar. Debe tenerse cuidado de no contami^{nar} el material con otras sustancias. Lo mismo podemos decir de las fibras como el algodón, lana, etc. El aler^{gen}o de tabaco, se prepara a partir de las hojas secas de la planta, el piretro, de las flores del piretro, etc. El material se corta en finas partículas con tije^{ras} y se desengrasa con éter.

Extracción y dializado: el material desengrasado y seco se extrae en solución de Evans o en solución glic^erinada, en proporción 1:5 peso:volumen o bien a cubrir el material, durante 72 horas, agitando ocasionalmente. Luego se filtra y el filtrado se dializa hasta obtener el ph de 7.0. Se esteriliza por filtración y se hace su control microbiológico.

Estensarización: el extracto obtenido se denomina concentrado o sin dilución (S.O.). Para las pruebas se emplean diluciones de 1:10 o 1:100. En UPP deben contener de 100 a 1000 UPP. (123, 130).

4.10.4.-ALIMENTOS.

Preparación del material: se deben emplear alimentos crudos, sin aditivos ni adulteraciones. Las frutas se escogen durante la estación de cosecha y se les quitan cáscaras y semillas, para utilizarlas en la preparación de extractos. Las carnes, vegetales y frutas, se pican + finamente o se muelen en molinos de carne o licuadoras. A las carnes se les elimina todo vestigio de grasa antes de molerlas. Las semillas como el trigo y el maíz, deben reducirse a una harina gruesa. El desengrasado de carnes, pescados y nueces se inicia con acetona, que aun que no es un eficiente solvente de grasas, se combina con el agua, de modo que ésta puede extraerse de la pulpa, para así permitir la posterior extracción de grasas con éter o tolueno, ya que el agua presente en las fibras musculares, evita la adecuada extracción de grasas por los solventes orgánicos. La acetona y el éter se eliminan por evaporación. Las verduras y frutas no precisan desengrasarse.

Extracción y dializado: la extracción se realiza con solución de Evans, en proporción 1:5 peso:Volumen o volumen:volumen, o bien la cantidad suficiente para cubrir el material desengrasado y seco. La extracción dura de 3 a 5 días para las harinas, a 4°C, y de hasta 1 semana para las carnes, agitando ocasionalmente. Debe protegerse el líquido de la putrefacción con una capa sobrenadante de cloroformo o toluol, especialmente en -

las carnes. La exacta cantidad de solución extractante no importa mucho, puesto que posteriormente los extractos se estandarizan. Muchos jugos de frutas y vegetales son ácidos y sobrepasan en poco tiempo la capacidad amortiguadora de las soluciones extractantes, por lo que es conveniente emplear las soluciones concentradas o bien, neutralizar el jugo antes de la extracción con NaOH al 5%. Al terminar la extracción, se filtra y el filtrado se dializa hasta obtener un pH de 7.0. Los extractos de cítricos pueden dializarse contra solución de CaCl_2 , que es alcalina, para neutralizar la acidez de el extracto. Los extractos de frutas y vegetales pueden concentrarse si es necesario. Se esteriliza por filtración, se envasan y se les hace su control microbiológico (180).

Cuando tenemos alimentos cuya naturaleza los hace de por sí puros, no es necesario seguir el proceso completo, tal como para la leche, huevo, albúmina, suero de caballo.

Leche: Los extractos de leche se elaboran de la fracción lactalbúmina, ya que la caseína raramente es un excitante importante. La lactalbúmina no precipita al pH isoelectrico de la caseína (4.6), por lo que se puede obtener mediante precipitación por acidificación; también se encuentra en el suero que fluye del gel de caseína obtenido por la acción enzimática de la renina.

a) Separación ácida: 100 ml de leche descremada se acidifican a $pH=4.6$ empleando HCl al 2%. Se deja reposar 10-15 minutos y se separa el sobrenadante.

b) Separación enzimática: 100 ml de leche descremada se le añaden 0.25 ml de renina al 1% y se deja reposar a $37^{\circ}C$ durante 30 minutos. Se separa el líquido por filtración o centrifugación.

Al líquido obtenido en a) o b), se le añade solución saturada de bicarbonato de sodio (1 ml por cada 100 ml de leche). Entonces se le añade solución de Evans hasta lograr una solución diluida 1:2 del líquido. Se esteriliza por filtración y se le hace su control microbiológico al envasar. (60).

Caseína: la caseína precipitada mediante separación ácida o enzimática, se lava 2 veces con agua destilada y centrifugando, se seca a $37^{\circ}C$. La extracción se hace en solución de Evans en proporción 1:5 (1 g de caseína y 5 ml de solución de Evans) durante 48 horas. Se filtra y el filtrado se esteriliza por filtración y se le hace su control microbiológico al envasar.

Clara de huevo: mediante una técnica muy cuidadosa, puede obtenerse la clara de huevos frescos bajo condiciones tales de esterilidad que la filtración esterilizante es innecesaria: la cáscara se lava con alcohol de 70%; la clara se extrae mediante una jeringa estéril o bien rompiendo la cáscara sobre la boca de un frasco de

téril y dejando escurrir la clara hacia el interior del frasco, cerca de la llama de un mechero y procurando que los dedos no toquen los bordes rotos de la cáscara; no debe romperse la yema. La clara se diluye 1:10 con solución de Evans esterilizada. También puede hacerse la dilución de la clara de huevo sin tomar las precauciones anteriores, pero es necesario filtrar para esterilizar, lo cual toma mucho tiempo debido a la densidad de la clara de huevo (180).

Suero de caballo: se realiza una dilución 1:10 del suero y se esteriliza por filtración, y se realiza el control microbiológico al envasar.

Estandarización: se estandarizan mediante dilución, haciendo una dilución de 1:10 para la mayoría de los alimentos, y de 1:100 para la albúmina de huevo, mariscos, pescados, leche y caseína y las nueces.

6.10.6.-VENENOS DE INSECTOS.

Los venenos de insectos grandes como abejas y avispas, pueden prepararse a partir del insecto completo, ya que es posible obtener el veneno por extracción del saco que lo contiene, mediante succión capilar o estimulación eléctrica. Las secreciones de otros insectos como las hormigas y los mosquitos, son virtualmente inaccesibles, por lo que sólo se preparan extractos del insecto completo.

Extractos del insecto completo: los insectos se la

van con agua fría corriente, para eliminar la miel y partículas extrañas, se secan sobre un papel secante y se trituran en un mortero hasta obtener una pasta espesa. La extracción de los componentes activos se realiza en solución de Coca durante 48 horas en el refrigerador, agitando con frecuencia. El sustrato obtenido se filtra a través de dos capas de gasa, el filtrado se esteriliza por filtración, se envasa y se le hace su control microbiológico. Se emplean concentraciones de 1, 10, 50, 100, 200, 500 y 1000 UNP/ml para las pruebas intradérmicas, realizando la inyección sucesiva a los 15 minutos de la anterior inyección, aumentando la concentración hasta la aparición de la primera reacción local positiva.

Extractos preparados con el veneno puro: el veneno puede extraerse mediante succión capilar del veneno luego de quitar el aguijón o bien colectando el veneno que dejectan los insectos al contacto con una rejilla electrizada; o bien extrayendo del cuerpo del insecto el sacco que contiene el veneno. El veneno se diluye en solución de coca o Coca glicerinada (algunos autores recomiendan diluir en solución salina que contenga albúmina, y dializar), se filtra para esterilizar y se hace la prueba de esterilidad al envasar. Estos extractos son mucho más potentes que los extractos del insecto completo, por lo que se usan en concentraciones de 1 microgramo por mililitro o aún menores, si el paciente es muy sensible (60, 1951).

6.10.7.-MEDICAMENTOS Y ALERGENS HORMONALES.

Los medicamentos como la aspirina, benzodiazepinas, etc., se preparan haciendo diluciones que van de 10^{-5} mg por mililitro del principio activo del medicamento, hasta concentraciones mayores que pueden llegar hasta 0.01 mg/ml o más. Las pruebas se hacen por intradermorreacciones, empezando con la mayor dilución y aumentando la concentración, hasta que se observa la aparición de la primera reacción cutánea positiva.

Las hormonas como el estradiol, estrona, progesterona, androsterona y desoxicorticosterona, se obtienen comercialmente en forma de cristales o disueltos en aceite y se emplean en pruebas cutáneas en diluciones de 10 a 1000 mg/ml, diluyendo en aceite puro de oliva y esterilizando mediante filtración. Las pruebas cutáneas por intradermorreacciones, se hacen empezando con la dilución mayor, aumentando la concentración hasta la observación de la primera reacción cutánea positiva (180, 234).

CAPITULO 7

"INMUNOGLOBULINA E
Y COMPLEMENTO"

INMUNOGLOBULINA E Y COMPLEMENTO.

7.1.-INMUNOGLOBULINA E.

Los anticuerpos de tipo IgE en el humano, son producidos en respuesta a antígenos parasitarios y a los alérgenos. Debido al bajo nivel de la IgE en el suero, no es posible detectar estos anticuerpos fácilmente, por lo que se requieren métodos muy sensibles.

La inmunoglobulina E, fué establecida definitivamente como un grupo diferente de inmunoglobulinas, gracias a los trabajos de los investigadores americanos K. y T. Ishizaka (93) quienes la identificaron en el suero de pacientes alérgicos, y por los suecos S.G.O. Johansson y H. Bennich (19, 88, 100), quienes estudiaron una inmunoglobulina de mieloma que llamaron IgND y que posteriormente, comprobaron que era una nueva clase de inmunoglobulinas, las IgE. Un resumen de las propiedades físicas, biológicas y fisiológicas de la IgE se hallan en la tabla 7.1.

7.1.1.-PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS E INMUNOLÓGICAS DE LA I_E.

Como todas las inmunoglobulinas, la I_E está formada por una unidad básica de cuatro cadenas, dos ligeras idénticas y dos pesadas idénticas. Las regiones constantes, están definidas por las cadenas pesadas llamadas épsilon (ϵ), y no presenta isotipos. Las cadenas ligeras pueden ser de tipo kappa (κ) o lambda (λ); su fórmula molecular puede entonces

des escribirse como sigue: IgE (λ) 2 ϵ 2 λ , o IgE (κ) 2 ξ 2 κ , según se trate de cadenas de tipo ligero kappa o lambda. La IgE es monomérica, de 8.2 Svedberg de sedimentación; su peso molecular es de 200 000 daltons. Posee un 11.7% de carbohidratos, por lo que es una glicoproteína. Posee enlaces disulfuro en la unión entre las cadenas ligeras y pesadas. Es un anticuerpo divalente, y es termolábil (16, 19, 20, 93, 202).

La digestión proteica con papaína, rinde el fragmento Fc que contiene el determinante antigénico épsilon, y dos fragmentos Fab compuestos de una cadena ligera y una porción de la cadena pesada llamada Fd que contiene un tercer determinante antigénico denominado ξ_0 , único para cada tipo de IgE. Los fragmentos Fab contienen los sitios combinantes para el antígeno.

La base molecular para la función mediadora de la IgE - en reacciones de hipersensibilidad tipo I, se debe a su actividad citotrópica hacia basófilos y mastocitos. Este citotropismo, reside en la región Fc de la molécula y es de tipo homocitotrópico, es decir, los anticuerpos IgE sólo reaccionan con basófilos y mastocitos de su misma especie animal; además, el citotropismo es termolábil, ya que 30 minutos de incubación a 56°C de estas células con anticuerpos IgE fijados a sus membranas, destruyen la unión IgE-membrana celular (92, 94, 95).

El promedio de IgE presente en los basófilos, es de - - 10 000 a 40 000 moléculas por célula (96); no existe correlación entre las moléculas de IgE ligada a las células y la - IgE circulante en lo que respecta a sus concentraciones. .

No fija el complemento cuando reacciona con antígenos, pero agregados de IgE, fijan componentes tardíos del sistema del complemento por la vía alterna (92, 93, 100).

7.1.2.-NIVELES DE LA IgE EN INDIVIDUOS SANOS.

La IgE comienza a sintetizarse en el feto a las 11 semanas de gestación y los niveles no se relacionan con los de la madre, lo que indica que no atraviesa la barrera placentaria. Aumenta con la edad con ligeras variaciones en la primera infancia, en parte debido a cambios estacionales no bien definidos (112, 204). No existen diferencias cuantitativas con respecto al sexo. En el adulto, los valores van de 17 a 455 nanogramos por mililitro, o sea de 7 a 145 unidades por mililitro (una unidad equivale a 2.4 nanogramos).

Se halla en secreciones como la saliva (1-10 ng/ml), secreción nasal (3-30 ng/ml), aunque puede hallarse ausente. En el calostro se encuentra en concentraciones 20 veces mayor que en el suero y en la orina, debido a la degradación de la IgE en el tracto urinario (103).

Mediante técnicas de inmunofluorescencia, se han detectado en el tracto gastrointestinal y respiratorio células plasmáticas productoras de IgE, lo cual indica la presencia de la IgE en estas mucosas (18, 20).

Debe tomarse en consideración que los niveles de IgE varían entre las diversas poblaciones del mundo.

7.1.3.-NIVELES DE LA IgE EN INDIVIDUOS NO SANOS.

El nivel de IgE, aumenta hasta 30 veces al valor normal en enfermedades de tipo alérgico y parasitarias (57, 177), - en enfermedades infecciosas y en el mieloma de tipo gamma-E. También se encuentran altos niveles de IgE en el fluido de - los pólipos nasales (134).

Entre los factores que influyen al nivel de la IgE - tenemos sobre todo los períodos de síntomas de las enfermedades alérgicas, que coinciden con las épocas de polinosis en los pacientes con fiebre del heno; en las parasitosis, antes de que el parásito invada tejidos y existe continuidad tisular y metabólica entre huésped y parásito, aumenta la IgE - (16, 18, 19, 20).

7.1.4.-METABOLISMO DE LA IgE.

La concentración de la IgE en el suero, es el resultado de la síntesis, catabolismo y un patrón de distribución (135, 219). La vida media de la IgE es de 2.3 a 4.4 días, con alta excreción en orina. En investigaciones basadas en pruebas PK (Praunitz-Küstner), se ha encontrado una vida media de 7 a - 13 días. Su afinidad por células circulantes y de órganos periféricos dificultan su estudio metabólico, lo que también - indica que no sólo es catabolizada en el espacio intravascular como el común de las inmunoglobulinas, sino que también existe un mecanismo catabólico específico para la IgE fijada a células.

No se halla bien establecido si en las alergias la IgE

se eleva debido a un bajo catabolismo, o una elevada producción, o a ambos. Los datos experimentales sugieren que el alto nivel de IgE en el plasma, se debe más bien a que ocurren condiciones que favorecen la elevada producción, por lo que la velocidad catabólica no parece ejercer un efecto importante en el nivel plasmático de la IgE (20, 136).

7.1.5.-FUNCIONES DE LA IgE.

Se han postulado algunas funciones benéficas para la IgE (19, 20): al provocar la liberación de histamina y otros vasodilatadores, se le puede implicar en el control de la microcirculación. Los anticuerpos específicos contra bacterias y virus, pueden ayudar en la localización de altas concentraciones de anticuerpos protectores de otra clase en el sitio de invasión. Es posible que la IgE contra helmintos, sea capaz de inducir el daño inicial al gusano (177) por sí misma, o bien, el daño puede resultar de el efecto de los constituyentes de mastocitos, como la histamina, liberados a través de un proceso inmunológico muy temprano en la infección. Se ha observado la fagocitosis de Schistosoma mansoni, facilitada por la presencia de IgE.

En cambio, en las enfermedades alérgicas, no proporcionan un mecanismo útil de defensa a la persona. Su persistencia a través de la evolución, indica que ha sido muy importante en la supervivencia del hombre, aunque obviamente en la actualidad su presencia en individuos alérgicos, no promueve su supervivencia.

7.1.6.-DETERMINACION DE LA IGE.

En el diagnóstico de las alergias, es de gran utilidad - la determinación de la inmunoglobulina E, ya que permite saber no sólo si existe o no un estado de sensibilización, si no también el grado de ésta. La determinación de la IgE, puede realizarse mediante titulación intradérmica, inmunodifusión radial (RID), ensayo inmunsorbente (PRIST) y ensayo radialalergosorbente (RAST).

7.1.6.1.-TITULACION INTRADERMICA.

Consiste en la determinación del punto final de la reacción, que es la mayor dilución del alérgeno que produce una respuesta cutánea positiva, en una secuencia su cesiva de diluciones.

Para ello se preparan diluciones sucesivas 1:5 del extracto concentrado: viales estériles con solución de Evans (4 ml), se etiquetan indicando la dilución que con tendrán (1:5, 1:25, 1:125, 1:625, etc, hasta 5^{-9} o más si así se requiere). Al primer vial (1:5) se le añade 1 ml del extracto concentrado, y se mezcla perfectamente. De esta primera dilución, se toma 1 ml la cual se añade al segundo vial (1:25), se mezcla, y de éste se toma 1 ml que se añade al tercer vial, etc., hasta completar - la última dilución.

Con las diluciones preparadas, se procede a la inyección intradérmica, comenzando con la dilución mayor y terminando con la menor dilución (1:5), en la piel de el brazo o la espalda, una debajo de la otra y separa-

das entre sí 3 cm. Las diluciones que no reaccionan preceden al punto final; éste se manifiesta como la primera respuesta eritematosa observable. En las subsiguientes intradermorreacciones de mayor concentración que la del punto final, se observa un progresivo aumento en el tamaño del eritema.

Una titulación intracérmica, nos permite también iniciar el tratamiento con una dosis segura, potente y escalada del extracto alérgico, basado en la sensibilidad cuantitativa individual (224).

Sin embargo, se corre el riesgo de reacciones indeseables en pacientes muy sensibles, por lo que los métodos *in vitro* son más seguros en estos casos.

7.1.6.2.-INMUNODIFUSION RADIAL.

Puede detectarse cuantitativamente la IgE, mediante placas de inmunodifusión radial (RID) cuando se halla en concentraciones de más de 800 U/ml, que resultan ser ya patológicamente elevadas. Este método resulta mejor, cuando se combina la cuantificación con la determinación autoradiográfica de los precipitados invisibles. Sólo se determina IgE total y en la actualidad ha sido desplazado por métodos de radioinmunoensayo, que son sumamente sensibles (5, 56, 85).

7.1.6.3.-ENSAJO INMUNSORRENTE.

La prueba radioinmunsorrente en papel (PRIST), es una técnica de radioinmunoensayo, con la que se cuantifica IgE total en suero o plasma.

das entre sí 3 cm. Las diluciones que no reaccionan preceden al punto final; éste se manifiesta como la primera respuesta eritematosa observable. En las subsiguientes intradérmorreacciones de mayor concentración que la del punto final, se observa un progresivo aumento en el tamaño del eritema.

Una titulación intradérmica, nos permite también - iniciar el tratamiento con una dosis segura, potente y escalada del extracto alergénico, basado en la sensibilidad cuantitativa individual (224).

Sin embargo, se corre el riesgo de reacciones indeseables en pacientes muy sensibles, por lo que los métodos in vitro son más seguros en estos casos.

7.1.6.2.-INMUNODIFUSION RADIAL.

Puede detectarse cuantitativamente la IgE, mediante placas de inmunodifusión radial (RID) cuando se halla en concentraciones de más de 800 U/ml, que resultan ser ya patológicamente elevadas. Este método resulta mejor, cuando se combina la cuantificación con la determinación autoradiográfica de los precipitados invisibles. - Sólo se determina IgE total y en la actualidad ha sido desplazado por métodos de radioinmunoensayo, que son sumamente sensibles (5, 56, 85).

7.1.6.3.-ENSAYO INMUNOSORRENTE.

La prueba radioinmunesorbente en papel (PRIST), es una técnica de radioinmunoensayo, con la que se cuantifica IgE total en suero o plasma.

Principio: es un radioinmunoensayo directo en el que se emplea una técnica de "sandwich" (13, 34, 112, 112). Se emplean discos de papel como fase sólida, a los cuales se halla ligada covalentemente la anti IgE, la cual reacciona con la IgE del suero o plasma durante la primera incubación. Luego de lavar, se añade una cantidad fija de anticuerpos anti-IgE radiomarcados con I^{125} formándose así un complejo ("sandwich") con las moléculas de IgE unidas a los anticuerpos de el disco de papel. Se elimina la radiactividad sobrante mediante lavados. La radiactividad del complejo se mide en un contador gamma. La cantidad de radiactividad medida es directamente proporcional a la concentración de IgE en la muestra.

Su principal limitación reside en que no es una prueba útil para diagnosticar un estado alérgico, ya que debe evaluarse junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio antes de darse un diagnóstico clínico definitivo.

Resulta un medio valioso para evaluar niños de padres atópicos, predispuestos hereditariamente a padecer un enfermedad atópica; la primera indicación de sensibilidad en estos niños, es una elevación de la IgE no específica, ya que la IgE específica se presenta tardíamente, por lo que el PRIST resulta un método útil para predecir una futura manifestación atópica, además de que es muy sensible para los bajos niveles de IgE presentes en bebés y niños (101,112).

Durante el tratamiento hiposensibilizante, la IgE total sufre un aumento de hasta un 10%, durante la 1a. semana de

tratamiento, por lo cual si el PRIST no revela tal aumento de IgE, deben reconsiderarse diagnóstico y terapia, ya que pueden ser erróneos. Debido a esta capacidad predictiva, el PRIST puede ser una útil herramienta para evitar un tratamiento inapropiado o innecesario (69, 101, 233).

7.1.5.4.-ENSAYO RADICALERGOSORBENTE (RAST).

La prueba radicalergosorbente (RAST), es un radioinmuno ensayo que nos permite determinar anticuerpos IgE específicos en suero o plasma. Podemos decir que es un análogo *in vitro* de las pruebas cutáneas.

Principio: el alérgeno de interés, covalentemente acoplado a un disco de papel (o partículas de celulosa), reaccionan con la IgE específica presente en el suero. Luego de eliminar la IgE inespecífica mediante lavados, se añaden anticuerpos anti-IgE radiomarcados con I^{125} , formando un complejo cuya radiactividad se mide en un contador gamma, siendo la radiactividad medida, directamente proporcional a la IgE específica presente en la muestra (2, 99, 101, 223).

Como prueba única, es de limitado valor diagnóstico, por lo que debe relacionarse con los datos clínicos y de otras pruebas de laboratorio (227).

Otras limitaciones del RAST:

a) La presencia de anticuerpos IgG, en el suero del paciente alérgico contra los alérgenos, pueden afectar la determinación de la IgE.

b) Los alérgenos al acoplarse covalentemente a la fase sólida (discos de papel), pueden sufrir alguna modificación,

Lo que reduce la sensibilidad de la reacción, ya que los -
alérgenos inalterados dan mejores resultados.

c) Puede haber reactividad cruzada entre varios pólenes,
no relacionados botánicamente o entre ciertos alimentos, pe-
ro estos mismos problemas se no observan en las pruebas cutáneas (24).

d) En alergia alimenticia, los anticuerpos IgE pueden -
no ser detectados debido a que pueden hallarse dirigidos con-
tra alérgenos que son alterados durante su procesamiento in-
dustrial, cocción o digestión, y por lo tanto no están pre-
sentes en el alimento original con que se hace la prueba (2,
87).

e) La capacidad de las reagentas para ligarse a su anti-
geno, varía de alérgeno a alérgeno. Consecuentemente, idénti-
cos resultados para diferentes alérgenos, no implica necesari-
amente equivalencia clínica (99).

f) No es tan sensible como las pruebas cutáneas, debido
a que no intervienen en la reacción 'in vitro' los efectores -
fisiológicos presentes en el plasma en las reacciones 'in vi-
vo' y que en alguna forma intervienen en la reacción de hipers-
ensibilidad.

g) En personas atópicas, se observan anticuerpos IgE que
se presentan síntomas asociados con el contacto con el -
alérgeno, por lo que su significación clínica es nula.

h) La IgE puede no detectarse en suero, pero hallarse -
presente en el tejido de mucosa, manifestándose en la sín-
drome rinitis y en pruebas cutáneas.

i) Los resultados del RAST se obtienen en 1 o 2 días, mientras que las pruebas cutáneas en sólo 10 o 15 minutos. - Además, el RAST requiere de controles propios para el manejo de sustancias radiactivas empleadas en la técnica; además, el decaimiento radiactivo gradual de la anti-IgE radiomarcada, requiere de constante remarcado en pocas semanas (vida media de 60 días). Esto se elimina en las nuevas metodologías en que se emplea anti-IgE marcada con fluoresceína (inmunofluorescencia), o métodos inmunoenzimáticos (p. ej. ELISA) - (135, 157, 140).

Ventajas del RAST. Con respecto al paciente, podemos enumerar varias ventajas: son innecesarios células o tejidos, sólo se requiere suero del paciente. Elimina el riesgo de contraer enfermedades como hepatitis viral al realizarse : a pruebas de transferencia pasiva. No se influencia por el uso de drogas antihistamínicas. Elimina el riesgo de obtener resultados falsos positivos, causados por el dermatografismo del paciente o por otros agentes histaminoliberadores. Elimina el riesgo de falsos negativos a problemas presentados por - pieles eczematosas o de pacientes muy jóvenes o de edad avanzada. Elimina el trauma físico. No es necesaria la presencia del paciente. Elimina el riesgo de reacciones peligrosas en pacientes muy sensibles, a cuando el alérgeno es muy potente (nueces, pescados y mariscos) y provoca reacciones sistémicas con pruebas cutáneas; lo mismo puede ocurrir de los venenos de insectos. (135, 140, 157).

En cuanto al material usado, los alérgenos asociados a

Los discos de papel son estables, mientras que el material empleado en las pruebas cutáneas, se vuelve menos potente con el tiempo. Se emplean alérgenos de diversos tipos: pólenes (54, 161) y polvo casero (54, 212), principalmente, hongos, pelos de animales (54, 226), alimentos (3, 45, 87, 227), y venenos de insectos (190).

El RAST tiene un papel importante en la selección de los alérgenos, antes de la terapia hiposensibilizante y para seguir la evolución de ésta.

Además de su utilidad clínica, el RAST puede también utilizarse para medir la potencia de los extractos alérgicos, ya sea empleando la técnica directa o la modificación llamada inhibición del RAST (71, 166, 176, 215).

Se ha comparado el RAST con otras pruebas de detección de la IgE, como las pruebas de provocación bronquial y nasal (161), pruebas cutáneas (2, 99, 101, 163), liberación de histamina por leucocitos y desgranulación de basófilos (99, 101). En general, se observa que el RAST posee la misma sensibilidad que las pruebas cutáneas por escarificación; es definitivamente menos sensible que las pruebas cutáneas intradérmicas, aunque se correlaciona bien con titulaciones intradérmicas, al igual que con la liberación de histamina y pruebas de provocación bronquial. La variabilidad en esta correlación, depende no sólo de tipo de prueba usada, sino también del alérgeno, (existe buena correlación con pólenes, no así con alimentos) y de la sensibilidad del paciente, ya que muchos recientes poco sensibles muestran un RAST negativo.

7.2.-EL COMPLEMENTO.

El sistema del complemento, es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo y de los procesos inflamatorios. Consiste de aproximadamente 20 proteínas séricas química e inmunológicamente diferentes, capaces de interactuar unas con otras, con anticuerpos y con membranas celulares (85, 144).

7.2.1.-ACTIVIDAD DEL COMPLEMENTO.

El resultado de la activación de este sistema abarca - desde la lisis de una gran variedad de células, bacterias, - virus, hasta la mediación directa de los procesos inflamatorios. Además, es capaz de promover la participación directa de otros sistemas efectores humorales y celulares e inducir la liberación de histamina de mastocitos, la migración directa de leucocitos, la fagocitosis y la liberación de constituyentes lisosomales de fagocitos.

Las proteínas del complemento, están normalmente en la - sangre como moléculas precursoras fundamentales funcionalmente inactivas. Comprenden aproximadamente el 15% del peso de la fracción globulina del plasma y son activadas en un orden preciso de reacciones bioquímicas.

Las proteínas del complemento, poseen una designación alfabética (que no tiene que ver con el orden con que reaccionan sino el orden en que fueron descubiertas): C1, C2, C3, C4, - C5, C6, C7, C8, C9; C1 es un complejo de 3 proteínas denominadas C1q, C1r y C1s, que se mantienen unidas por Ca^{2+} (144).

Existen dos vías de activación del complemento, la vía clásica y la vía alterna. Ambas llevan al mismo resultado: - la lisis de membranas celulares.

7.2.1.1.-VIA CLASICA.

Es la responsable de la lisis de la mayoría de las células sensibilizadas por anticuerpos. La activación de la vía clásica, se inicia con la interacción del antígeno con el anticuerpo fijador del primer componente del complemento: la proteína C1; tales anticuerpos son de tipo IgG o IgM, ya que no todas las inmunoglobulinas activan el complemento, como es el caso de la IgE.

C1 se une al fragmento Fc del anticuerpo (IgG o IgM) mediante un enlace no covalente fácilmente reversible. El enlace al anticuerpo activa a C1, lo cual se indica con una barra: $\overline{C1}$, que entonces actúa como una esterasa capaz de interactuar con el siguiente componente de la secuencia: C4 y C2. Estos a su vez son activados y son capaces de interactuar con el siguiente componente: C3, y éste a su vez con los siguientes componentes, en una cascada. Tres de los componentes: C5, C6 y C7 forman un complejo trimolecular, que es capaz de interactuar con la superficie celular reaccionando como una unidad funcional independiente, causando modificaciones químicas en la membrana, sitio en el que la membrana se vuelve susceptible al ataque de C8 y C9, componentes productores de la lisis de la membrana.

Cuando todos los componentes del complemento han reaccionado, ocurre entonces la lesión de la membrana celular a causa de que se genera en la capa bilipídica de ella, un canal transmembrana por el que prácticamente se vacía el contenido celular (144).

7.2.1.2.-VIA ALTERNA.

Su activación no requiere de la presencia de anticuerpos fijadores del complemento, aunque puede activarse mediante agregados de anticuerpos de IgA, IgG, IgM e IgE y por complejos inmunes. Esta vía también se activa, por la presencia de superficies bacterianas y fungales que poseen polisacáridos formados por subunidades repetitivas. Esta vía no utiliza los componentes C1, C4 y C2.

También es posible la activación del complemento o el consumo de sus componentes, por las proteínas del sistema de la coagulación: la plasmina, el fibrinógeno y las kininas.

El resultado es el mismo que el obtenido en la vía clásica: la lisis de las membranas celulares (144).

7.2.2.-CONTROL DE LOS MECANISMOS DE REACCION DEL COMPLEMENTO.

La activación incontrolada del complemento, se previene gracias a la facilidad de los sitios complementos, activados y generados en múltiples etapas de reacción. Además, se han identificado varias proteínas séricas que regulan y limitan la activación del complemento. Estas proteínas se unen a los

atacan enzimáticamente sólo a las formas específicamente activadas de los componentes. Así tenemos: el inactivador de $\overline{C1}$ (inhibidor de la estearasa $\overline{C1}$), que es una enzima inhibidora multiespecífica, ya que no sólo inactiva a $\overline{C1}$ sino también a la plasmina, la kalikreína, el sistema formador de ki ninas y a las enzimas del sistema de coagulación. El inacti vador de C3b. La beta-globulina-H que se une a C3b y acelera la acción destructiva del inactivador de C3b. El inactivador de anafilatoxina, que destruye la actividad biológica de C3a y C5a, (fragmentos de C3 y C5 que se denominan anafilatoxinas, por su capacidad de producir reacciones sistémicas semejantes a las reacciones de hipersensibilidad tipo I mediadas por IgE). (128, 137).

7.2.3.-CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS DE LA ACTIVACION DEL COMPLEMENTO.

Principalmente ocurre daño citolítico de eritrocitos, bacterias, virus con capa lipoproteínica y linfocitos, con diversos grados de eficiencia en cada caso (154).

El sistema del complemento no sólo actúa como conjunto, sino que sus componentes individuales son capaces de producir reacciones biológicas como son los procesos inflamatorios, facilitar la localización de agentes infecciosos y la solubilización de complejos inmunes (121, 157, 198).

Los componentes C4 y C2, actúan sobre la formación inactiva de fibrina y resistan así un proceso diferente al de las reacciones de fibrinólisis que es iniciado por IgG.

La actividad de anafilatoxina de los fragmentos C3a y C3b, llevan a la contracción del músculo liso, elevan la permeabilidad vascular causando finalmente edema.

En áreas de daño tisular no específico, el complemento media la acumulación local de leucocitos en el sitio de reacción.

Se ha determinado actividad quimiotáctica en los productos de la activación de C3, C5 y en el complejo C567, por lo que puede ser útil en la evaluación de pacientes con enfermedades infecciosas, inflamatorias o neoplásicas.

Las lesiones en el fenómeno de Arthus dependen en parte de la activación del complemento. Es ejemplo de una reacción inflamatoria, inducida por la formación de complejos inmunes dentro de los tejidos y que son capaces de activar el complemento.

C3a también ha mostrado su actividad como opsonina: favorece la fagocitosis y liberación del contenido lisosomal - y de otros constituyentes celulares que facilitan la destrucción de agentes infecciosos.

Aunque aparentemente el complemento es un sistema efector independiente de las reacciones alérgicas, puesto que la IgE es incapaz de fijarlo, existen estudios que nos muestran ciertas relaciones entre la activación del complemento y las reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE. En pacientes atáxicos, se ha observado un aumento en la liberación de histamina mediada por el complemento (157). En conejos deficientes en el componente C6, existe una gran tolerancia a grandes dosis de óxido nitroso (158). (recursos de reactivos)

glandinas), que en conejos normales resultan letales, ya que causan la formación de trombos plaquetarios en los microvasos de los pulmones. Como muchas reacciones alérgicas están relacionadas a la actividad del sistema prostaglandinas, su asociación con la deficiencia de un componente del complemento es de interés en futuras investigaciones (135).

Se ha observado que los extractos alérgicos de cereales, algodón y polvo casero, activan el complemento en ambas vías (alterna y clásica), implicando la acción del complemento en las reacciones alérgicas (153, 225). Ello se debe a la presencia en los extractos de endotoxinas bacterianas, que se hallan en los polvos caseros, fibras textiles y en los cereales almacenados. También se ha observado consumo del complemento, en casos de sensibilidad al huevo y pescado (25); los extractos de venenos de insectos, también son capaces de activar el complemento (49).

7.2.4.-METODOS DE DETECCION Y CUANTIFICACION DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEMENTO.

Las funciones normales del sistema del complemento son la producción de inflamación, daño tisular y citolítico, por lo que en muchas enfermedades, actúa como un mecanismo de defensa. Sin embargo, la actividad del sistema del complemento y de sus componentes individuales puede hallarse disminuida o aumentada en diferentes enfermedades, por lo que la cuantificación y ensayo funcional del complemento, es de ayuda en la evaluación de la enfermedad (85, 64).

Por ejemplo: C3 y C4 se hallan aumentados en el lupus - eritematoso y en otras enfermedades reumáticas. C3 se halla disminuido en enfermedades septicémicas infecciosas por bacterias gramnegativas, hongos y en hepatitis. C1 y C4 se hallan disminuidos en la malaria. En enfermedades dermatológicas como el pénfigo vulgar y en enfermedades renales nefríticas, el complemento juega un papel importante al mediar el daño tisular que ocurre. En anemias hemolíticas autoinmunes y en la hemoglobinuria nocturna paroxística, el complemento tiene un papel importante al participar en el daño a la membrana del eritrocito. En ciertas enfermedades genéticas raras, algunos de los componentes del complemento poseen baja actividad o incluso una actividad no detectable (85).

En la detección de los componentes del complemento, podemos definir básicamente dos tipos de metodologías: los ensayos antigénicos o inmunquímicos, y los ensayos que miden la actividad funcional del complemento y sus componentes.

7.2.4.1.-LOS ENSAYOS ANTIGENICOS O INMUNQUIMICOS.

Son altamente específicos, aunque tienen la desventaja de que no distinguen entre moléculas activas o inactivas; - principalmente, se emplea la inmunodifusión radial simple (en inglés: RID); C3 y C4 son los componentes cuantificados rutinariamente, aunque también es posible obtener antisuero contra C1q, C1s, C5, C6, C9, properdina y factor B. (56).

Existen varias desventajas en el análisis de los componentes del complemento mediante RID: el intervalo de tiempo requerido para completar la reacción es de 24 a 48 horas. Es

ta incubación prolongada favorece la aparición de valores séricos falsamente elevados cuando se encuentran presentes componentes activados del complemento; esto aumenta el potencial de interacción del suero y la agarosa, favoreciendo la posibilidad de que tales productos activados puedan formarse. Puede minimizarse este efecto empleando plasma con EDTA como anticoagulante (65).

Otros métodos alternos para el análisis del complemento son: la electroinmunodifusión por la técnica de Laurell, métodos nefelométricos de inmunoprecipitación empleando nefelometría de láser (75).

7.2.4.2.-LOS ENSAYOS QUE MIDEN LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DEL COMPLEMENTO Y SUS COMPONENTES.

La determinación de la actividad hemolítica total del complemento se mide determinando la capacidad de la vía clásica del complemento para lisar eritrocitos sensibilizados con anticuerpos contra los eritrocitos. Como se requieren las 9 proteínas del sistema para la hemólisis, se obtiene un ensayo funcional de gran valor (64, 76, 144).

a) Prueba cualitativa: la determinación de la actividad hemolítica del Complemento en placas de agarosa que contienen eritrocitos de carnero, es valiosa para realizar rápidamente (1 hora) un gran número de muestras. El suero se difunde radialmente desde los pocitos practicados en la placa para producir un anillo de lisis aproximadamente proporcional a la cantidad de complemento presente. La lisis se registra como normal, baja o ausente, basándose en la compara-

ción con la actividad determinada en un suero normal (75).

a) Ensayo cuantitativo: se determina la cantidad (unidades del suero) de complemento necesario para lisis el 50% de los eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos anticarnero (hemolisinas); se denominan unidades 50% hemolíticas del complemento ó CH_{50} . Este tipo de ensayo provee una estimación más precisa de la actividad total del Complemento, de la integridad de la vía clásica y de los mecanismos de ataque a la membrana celular. Es importante recordar que este tipo de ensayo, depende de varios factores que se deben controlar cuidadosamente: la concentración de los eritrocitos de carnero, la cantidad y calidad de los anticuerpos usados para la sensibilización, la fuerza iónica, la concentración de iones Mg y Ca, el pH del sistema, el volumen de reacción y el tiempo y temperatura de incubación.

De modo similar, se determina la actividad hemolítica de los componentes individuales del complemento en el suero, empleando todos los componentes en exceso, excepto el que se determina. Se prueba así, la capacidad del suero para proporcionar el componente faltante e inducir la lisis de los eritrocitos. Esta técnica posee una firme base teórica y matemática. Los valores hemolíticos se expresan como unidades efectivas o moléculas. Debido a la naturaleza complicada de estos ensayos y de los reactivos usados, sólo se usa para detectar deficiencias hereditarias de componentes del complemento, que no pueden detectarse por métodos rutinarios y para evaluar la actividad de las proteínas del complemento (76).

7.2.4.3.-OTROS ENSAYOS DE LA FUNCION DEL COMPLEMENTO.

El inhibidor de C1 (C1-INH) puede detectarse mediante RID o técnicas nefelométricas; sin embargo, ciertos pacientes poseen niveles antigénicamente normales pero no funcionales. La titulación definitiva puede lograrse midiendo la acción inhibidora de C1-INH sobre C1 empleando como sustrato sintético Acetil-L-tirosina etil ester (ALTEe) (76).

Fagocitosis de levaduras: una anomalía de C5, manifestada por un nivel normal de la proteína y de la actividad hemolítica, pero con una capacidad disminuída para opsonizar partículas de levadura para su fagocitosis, es característica de una forma severa de la enfermedad de Leiner.

Conversión in vivo de C3: Los fragmentos de C3, producidos in vivo, pueden ensayarse por métodos que miden los cambios en la movilidad electroforética de C3, o bien los fragmentos de C3 con antisueros específicos. Estos métodos pueden ser: inmunoelectroforesis, contraelectroforesis y RID con antisueros monoespecíficos.

Inmunofluorescencia: los componentes del complemento depositados en los tejidos, puede detectarse usando la inmunofluorescencia directa con antisueros monoespecíficos fluorescentes.

Título de inmunoadherencia: mediante la aglutinación de eritrocitos cubiertos con anticuerpos contra los componentes del complemento, a los que se añaden fijos en proporción a la concentración relativa en el suero; la dilución más alta que presenta aglutinación es el punto final.

"in vivo", se obtiene evidencia directa de la activación del complemento mediante estudios metabólicos en los que se emplean componentes purificados y radiomarcados (54, 76, 85).

CAPITULO 3

"INMUNOTERAPIA"

I N M U N O T E R A P I A .

Las enfermedades de tipo alérgico, son el resultado de la acción de los mediadores farmacológicos liberados por macrocitos y basófilos, como consecuencia de la interacción de antígenos alérgicos con anticuerpos IgE fijados en la membrana de dichas células, y que afectan a diversos órganos.

El conocimiento de los mecanismos inmunológicos de la reacción alérgica, resultan de gran utilidad para planear la terapéutica indicada que debe seguirse, y que pueden ser: - eliminación del agente causal o interferencia en los mecanismos inmunológicos y químicos de la reacción.

8.1.-ELIMINACION DEL AGENTE CAUSAL.

La eliminación del agente causal o alergeno, es la primera medida a tomar, ya que al no haber contacto con el alergen, no se presentan las reacciones alérgicas. Esto resulta sencillo para el caso de alergenos ingestantes como los alimentos y medicamentos orales, pero no lo es tanto con sustancias inhalables. Por ejemplo, el polvo casero es un alergeno que no puede eliminarse por completo, pero puede disminuirse la exposición al mismo, mediante una limpieza minuciosa de la casa, el empleo de sistemas de ventilación y filtración de aire, así como el uso de materiales sintéticos no alérgicos en las ropas, cortinas, sábanas, etc.

Si se es alérgico a pelos y caspas de animales, debe -

deshacerse de los animales.

Las esporas de hongos y los granos de pólenes, son difíciles de erradicar del medio ambiente, siendo de gran ayuda el uso de filtros de aire. Las esporas de hongos, pueden disminuirse evitando que proliferen los mohos y manteniendo bien ventiladas las habitaciones, además de reducir la humedad con deshumidificadores. En el caso de los pólenes, es de gran ayuda al paciente el conocimiento de las épocas de polinosis, lo que permite al médico elegir el tipo de tratamiento a seguir, como veremos más adelante (121, 140, 157).

8.2.-MECANISMOS INMUNOQUÍMICOS DE LA REACCIÓN ALÉRGICA.

Los productos de la desgranulación de basófilos y mastocitos (histamina, SRS-A, ECF-A, etc.), poseen un modo de acción particular y son liberados mediante mecanismos específicos. Conociendo tales modos de acción y mecanismos de liberación, es posible buscar métodos que nos permitan interferirlos y así evitar las manifestaciones alérgicas.

8.2.1.-ACCIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS MEDIADORES QUÍMICOS DE LA REACCIÓN ALÉRGICA Y SUS MECANISMOS DE LIBERACIÓN.

HISTAMINA: se produce por la acción de la histidina-desaminasa sobre la histidina. Tanto enzima como sustrato se hallan ampliamente distribuidos en el organismo. Se elabora principalmente en mastocitos y basófilos. Causa la contracción del músculo liso, sobre todo en bronquiolos y grandes vasos sanguíneos. Existen dos tipos de receptores

para la molécula de histamina en las células musculares: H_1 y H_2 , que median efectos opuestos: -relajación y contracción, respectivamente, por lo que el mayor número de receptores de uno u otro tipo llevan a un estado de relajamiento o -contracción al liberarse la histamina. En el hombre, son más numerosos los receptores de tipo H_1 por lo que la liberación de histamina crea relajamiento e hipotensión, además de permeabilidad vascular con el consiguiente edema (8, 14, 148).

SEROTONINA: Se produce mediante la descarboxilación del triptofano y la hidroxilación en la posición 5 del anillo bencénico de la molécula. - Realmente posee poca actividad en las reacciones alérgicas, y actúa de modo similar a la histamina (8).

SRS-A: La sustancia de reacción lenta de la anafilaxia se genera y secreta por los basófilos y mastocitos durante las reacciones alérgicas. El -Leucotrieno C4 (LTC4) y sus metabolitos LTD4 y -LTE4 se han identificado como los mayores constituyentes del SRS-A. Estos leucotrienos son pepti-dolipidos que se derivan del ácido araquidónico. Son potentes broncoconstrictores, importantes en la fisiopatología del asma (169, 197).

ECF-A: Es el factor quimiotáctico de los eosinófilos en la anafilaxia; esta compuesto de tetra-péptidos ácidos e hidrofóbicos de bajo peso mole

cular, presente en basófilos, mastocitos, neutrófilos y eosinófilos. Su acción se relaciona con un mecanismo de retroalimentación que atrae eosinófilos, al sitio de reacción, los cuales liberan sustancias que metabolizan los mediadores de la respuesta alérgica (25, 107, 108).

BREDIQUININA: Generada por proteasas, tiene actividad vasodilatadora, aumentando la permeabilidad vascular.

PAF: o factor activador plaquetario, causa la liberación de histamina y serotonina al activar las plaquetas, aumentando la concentración de éstas en sangre. (22).

PROSTAGLANDINAS: Son producidas del ácido araquidónico mediante una cascada enzimática. Las E1 y E2 son de acción antiinflamatoria, y las F2 antagonizan este efecto (158).

COMPLEMENTO: Su activación causa la liberación, aunque por una vía diferente a las reacciones de hipersensibilidad, por lo que su acción en las reacciones alérgicas no es clara.

La brediquinina, el PAF, las prostaglandinas y el complemento, son mediadores inflamatorios presentes en mastocitos, basófilos y plasma, cuya función no se ha-
lla bien determinada en las reacciones de tipo alérgico.

Los mecanismos bioquímicos inter celulares de libe

ción de los mediadores de la inflamación, se inician, en los fenómenos alérgicos, al unirse el alérgeno divalente a dos moléculas vecinas de IgE fijadas a basófilos y mastocitos vía su porción Fc. El proceso completo de liberación de los mediadores químicos, sólo se conoce fragmentariamente; se sabe que las reacciones bioquímicas dependen de la energía que proporciona la vía glicolítica; el AMP cíclico se eleva al aumentar la fosforilación, y a la vez actúa como modulador del mecanismo liberador. La presencia de calcio iónico, es necesaria para activar enzimas y para la formación de microtúbulos y microfilamentos contráctiles (8, 121, 157).

8.2.2.-INTERFERENCIA DE LA ACCION DE LOS MEDIADORES QUIMICOS Y DE SU LIBERACION.

La acción de los mediadores químicos puede ser inhibida mediante el empleo de antagonistas farmacológicos, como son los antihistamínicos, que actúan como compuestos de estructura similar a la histamina, que por inhibición competitiva, se unen a los receptores de la histamina. El SRS-A es inhibido por la dietilcarbama^zina. La contracción de los músculos bronquiales, puede reducirse con catecolaminas de un modo no competitivo, causando el relajamiento de las fibras musculares bronquiales al unirse a los receptores α_2 de las fibras musculares bronquiales (en la mucosa bronquial, se en-

cuentran receptores alfa, beta1 y beta2 por los que se transmiten los efectos del sistema nervioso simpático.-- Los receptores beta, son los únicos que median la bronco dilatación; si son bloqueados o su número reducido, las señales del sistema nervioso simpático, llegan a los receptores alfa-adrenérgicos, colinérgicos, histaminérgicos y triptaminérgicos, no pudiendo ser suficientemente contrarregulados. Esto conduce a la broncoconstricción). La epinefrina y el isoprotenerol, tienen efectos colaterales de hipertensión y taquicardia, debido quizá a que estimulan los receptores cardiacos beta 1; por ello es que se desarrollan drogas selectivas para los receptores beta 2. La aminofilina, una droga inhibidora de fosfodiesterasas necesarias en la fosforilación, al igual que los beta-simpaticomiméticos, producen dilatación bronquial al elevar la concentración de AMP cíclico, que entonces interviene en el metabolismo de las células del músculo bronquial, glándulas o pared bronquial previniendo la broncoconstricción, retención de moco y disturbios secretorios. Se ha visto que la liberación de histamina por sí misma inhibe este mecanismo, mediante un proceso de retroalimentación. El cromoglicato disódico, inhibe la desgranulación de mastocitos y previene así la liberación de mediadores. Otros medicamentos de propiedades similares al cromoglicato, como los derivados esteroideos de xantinas, acetaminofeno y ácidos oxalínicos, tienen actividad inhibitoria de la liberación

es los mediadores. El frío y la colchicina son inhibidores de la formación de microtúbulos y microfilamentos, afectando también la liberación de mediadores (121, 140, 157).

8.3.-INTERFERENCIA DE LA REACCIÓN ANTIGENO-ANTICUERPO.

La interacción de un alérgeno con el anticuerpo específico, es la llave que abre las reacciones bioquímicas intracelulares, que terminan en la liberación de los mediadores químicos cuya acción sobre el tejido u órgano afectado, es la principal causa de los trastornos alérgicos. La inhibición de esta interacción antígeno-anticuerpo, provee otra forma de evitar tales trastornos.

8.3.1.-INHIBICIÓN DE LA REACCIÓN ANTIGENO-ANTICUERPO.

La reacción antígeno-IgE, puede inhibirse mediante la estimulación de la producción de anticuerpos bloqueadores, que compiten con la IgE por el antígeno. Además de estos anticuerpos bloqueadores, ocurre disminución de la formación de anticuerpos IgE, debido a la supresión de células productoras de IgE por linfocitos T supresores, cuya proliferación estimula durante la inmunoterapia. La inmunoterapia es pues, el tratamiento que recibe el paciente alérgico, mediante inyecciones del material alérgico al que es sensible, en un intento de reducir su sensibilidad. También se le llama hiposensibilización o desensibilización (147, 151, 153).

Los anticuerpos bloqueadores formados son de tipo

IgG y están dirigidos contra alérgenos específicos libres, no ligados a mastocitos, por lo que compiten con la IgE por el alérgeno libre, reduciendo la concentración efectiva del alérgeno y por consiguiente, ocurre una reducción de la liberación de los mediadores químicos. Estos anticuerpos bloqueadores, llegan a niveles muy altos en el tratamiento inmunoterápico, reduciendo el nivel de IgE sérica por largos períodos de tiempo. Se han observado anticuerpos de clase IgG4 en el suero de pacientes asmáticos, específicos para alérgenos (79). En los pacientes tratados se observa que decrece la sensibilidad 'in vitro' de los leucocitos para liberar histamina.

8.3.2.-EFICACIA Y SEGURIDAD DE LA INMUNOTERAPIA.

Estudios controlados en pacientes que reciben inmunoterapia muestran que, dependiendo de el antígeno usado, se logran resultados satisfactorios en un gran porcentaje de pacientes, quienes desarrollan una gran tolerancia a los alérgenos y reducen sus síntomas en gran medida. Los mejores resultados se han observado en los casos de alergias a pólenas (94%) y polvo casero (70%) (147). En cuanto a la seguridad de la inmunoterapia, existe el riesgo de desencadenar reacciones locales o sistémicas en pacientes muy sensibles, por lo que la vigilancia médica es necesaria durante el tratamiento. Se han reportado varios casos de poliarteritis nodosa en algunos pacientes en tratamiento, pero no se ha estable

Una relación directa con la inmunoterapia, aunque se cree que el desarrollo de la enfermedad, pueda deberse a un daño mediado por complejos antígeno-anticuerpo (157).

8.3.3.-ANTIGENOS EMPLEADOS.

Los antígenos de pólenes y polvo casero, son los que dan mejores resultados y son por ello los más usados. No es recomendable usar otros antígenos en la inmunoterapia, como por ejemplo: alimentos, los cuales basta eliminar de la dieta y las caspas y pelos de animales, que también pueden eliminarse (además de que son muy potentes y llegan a causar reacciones severas); sólo en ciertas circunstancias, llegan a aplicarse tratamientos hiposensibilizantes con sustancias epidérmicas a personas que están en contacto con ellas debido a su trabajo (157). La inmunoterapia con extractos de venenos de insectos (175) también ha dado buenos resultados.

Los antígenos empleados en la hiposensibilización, se eligen a través de los datos aportados por la historia clínica y las pruebas cutáneas. Los antígenos inyectados, pueden ser únicos o mezclas de aquellos a que el paciente sea sensible y en proporciones adecuadas a la sensibilidad que se tenga a cada uno de ellos.

8.3.4.-DOSIFICACION DEL TRATAMIENTO.

El tratamiento se inicia generalmente con la prepa

ración del alergeno más diluida, que generalmente es de 1:5000 (peso/volumen), o bien la dilución menor que da prueba negativa en una titulación intradérmica, aumentando la concentración hasta llegar a la más concentrada, generalmente de 1:50. Por ejemplo:

CONCENTRACION	DOSES
1:5000-----	0.05 ml
" -----	0.10
" -----	0.15
" -----	0.20
" -----	0.30
" -----	0.40
" -----	0.50
1:500 -----	0.05
" -----	0.10
" -----	0.15
" -----	0.20
" -----	0.30
" -----	0.40
" -----	0.50
1:50 -----	0.05
" -----	0.10
" -----	0.15
" -----	0.20
" -----	0.30
" -----	0.40
" -----	0.50

Cada dosis se inyecta sucesivamente en la piel de

terna del brazo, empleando una jeringa tipo tuberculina o insulina, una semanalmente, durante el tiempo necesario para llegar a la dosis con mayor concentración.

Las inyecciones debe hacerlas el médico especialista, en prevención de que al aumentar la concentración del extracto y la dosis, se presenten reacciones peligrosas para el paciente, y en caso de que ocurran, poder actuar adecuadamente (64, 121, 140, 157).

La duración de la terapia dependerá de la respuesta del paciente. Al llegar a la dosis de mayor concentración, se administra una dosis de mantenimiento de concentración igual a la de mayor concentración en el esquema del tratamiento, que se administra cada 2 o 4 semanas, hasta que el paciente se halla completamente libre de síntomas, antes de detener la inmunoterapia. La dosis de mantenimiento puede ser menor que la mencionada, o aun mayor, dependiendo de aquella en que el paciente ya no presente reacción cutánea a la inyección intradérmica.

Los resultados pueden ser persistentes, quedando el paciente libre de síntomas; en otros, se presentan síntomas alérgicos mínimos, que pueden ser controlados con medicamentos; puede acontecer también que los síntomas se recrudescan al abandonarse la terapia, por lo que seba continuarse el tratamiento.

8.3.6.-TIPOS DE TRATAMIENTO QUE SEBI ELIZANTE.

Según la época del año en que se aplican, pueden ser (17):

- a) Coestacional: se aplican las inyecciones cuando el paciente presenta los síntomas (durante la estación de polinosis). Resulta poco satisfactoria.
- b) Preestacional: se inicia entre 4 y 1 meses antes de la estación de polinosis a que el paciente es sensible, se interrumpen durante la estación de polinosis, y se reinician al año siguiente. Tampoco es muy satisfactorio.
- c) Perenne: consiste en la inyección del antígeno - durante todo el año, siguiendo el esquema de inyecciones. Es la más recomendable.

8.4.-OTROS ANTIGENOS EMPLEADOS EN LA INMUNOTERAPIA.

8.4.1.-LAS VACUNAS BACTERIANAS.

Existe controversia en cuanto a la utilidad de las vacunas bacterianas. Estudios hechos durante 20 años, demuestran que las vacunas bacterianas autógenas no ofrecen mayor ayuda que las inyecciones de placebos, (éstos dan hasta un 50% de resultados satisfactorios) (135). -

En el asma bronquial, debido a infecciones bacterianas, la terapia generalmente se dirige hacia un tratamiento sintomático, con simpaticomiméticos, cortisona y sus derivados, no tomándose en cuenta el estado alérgico bacteriano, por lo que no se da tratamiento antibiótico ni hiposensibilizante. Desde el punto de vista inmunológico, se ha observado que la producción de anticuerpos inespecíficos, a través de la hiposensibilización

vacunas bacterianas es efectivo, al grado de - que son capaces de prevenir broncoespasmos (12, 43, 135).

Podemos afirmar que las vacunas bacterianas, influyen en la respuesta inmunológica de las alergias microbianas, prestando ayuda en la mejoría del paciente. En la actualidad, se piensa que la falla principal de las vacunas bacterianas en los tratamientos hiposensibilizantes, se deben a que las infecciones respiratorias en pacientes asmáticos, son en realidad causadas por los virus que afligen a la mayoría de la población, y no debi das a infecciones bacterianas (12).

Un ejemplo de vacuna bacteriana de uso común:

Microorganismo	Millones/ml
<u>Neisseria catarrhalis</u> -----	100
<u>Streptococcus pneumoniae</u> -----	200
<u>Klebsiella pneumoniae</u> -----	50
<u>Haemophilus influenzae</u> -----	150
<u>Streptococcus</u> (hemolítico y Viridans)-----	100
<u>Staphylococcus aureus</u> -----	100
<u>Staphylococcus albus</u> -----	50
Total-----	750

Esquema de hiposensibilización:

Vacuna de 7.5 millones de gérmenes/ml	
Dosis	Volumen (ml)
1 -----	0.05
2 -----	0.10

3	-----	0.30
4	-----	0.50
5	-----	0.80
6	-----	1.00

Vacuna de 75 millones de gérmenes/ ml

7	-----	0.10
8	-----	0.30
9	-----	0.50
10	-----	0.80
11	-----	1.00

Vacuna de 750 millones de gérmenes/ml.

12	-----	0.10
13	-----	0.20

Aumentando 0.1 ml en cada dosis, hasta completar 1.00 ml (dosis # 20).

Las inyecciones se aplican 2 semanalmente hasta la última dosis. La tolerancia a las inyecciones es buena, aunque en ciertos casos se presentan reacciones locales leves como eritema o inflamación; muy pocos son los casos que reportan fiebre, cansa o malestar general.

Preparación de una vacuna bacteriana: en primer lugar, han de aislarse e identificarse los microorganismos que se van a emplear en la vacuna, para obtener luego una abundante masa microbiana, subcultivando en medio de cultivo enriquecido como el medio geloso sangre. Los microorganismos así obtenidos, se suspenden en solución salina isotónica estéril y se añaden al volumen calculado a 55 °C

30°C durante 1 a 2 horas, o a mayor temperatura si el microorganismo es termorresistente, (a esta temperatura no se destruyen los determinantes antigénicos del microbio y ya no es viable). Se debe confirmar la viabilidad, sembrando unas gotas de la suspensión inactivada en un medio enriquecido como el de tinglicolato; si no hay crecimiento bacteriano, se hacen los cálculos necesarios para ajustar la suspensión a la concentración que se le requiera, empleando métodos turbidimétricos. Si no, se debe activar a mayor temperatura. Puede añadirse etilmercuritiisalicylate de sodio al 10% como conservador (123).

8.4.2.-VENENOS DE INSECTOS.

Los venenos de insectos picadores proveen protección adecuada en la mayoría de los casos, aunque en algunos no ocurre así, debido probablemente a una inadecuada manutención del programa de inyecciones. El uso de venenos, extraídos directamente, da una protección superior a la de los extractos preparados con el insecto completo, y su aplicación debe seguirse con un cuidadoso programa de inyecciones y una estrecha vigilancia médica (174, 175).

8.4.3.-OTROS AGENTES INMUNOTERAPÉUTICOS DE ACCIÓN INESPECÍFICA.

Se han empleado extractos de glóbulos rojos como ayuda en la inmunoterapia del asma intrínseca, en la que se causa la polinosis nasal. Los glóbulos rojos son

de etiología múltiple, y se les relaciona mucho a estados alérgicos como rinitis y asma. Pueden eliminarse mediante cirugía y esteroides, pero no con inmunoterapia, sin embargo, los extractos resultan de ayuda en la eliminación de algunos síntomas alérgicos en algunos pacientes (135, 196).

Otro método inmunoterápico inespecífico, es el empleo de la sustancia de Griel o proteosa urinaria. Esta es una sustancia que se excreta en la orina durante el ataque alérgico. Está formada por proteínas o fracciones proteínicas del alérgeno que se excreta del organismo a través de la orina. Estos alérgenos se han empleado con resultados inconstantes. Se ha señalado su utilidad en padecimientos alérgicos, úlceras aftosas y dermatitis (42, 58, 179).

CAPITULO 9

"NUEVOS METODOS DE
INMUNOTERAPIA Y DIAGNOSTICO"

NUEVOS METODOS DE INMUNOTERAPIA Y DIAGNOSTICO .

9.1.-INMUNOTERAPIA.

La terapia más simple en el tratamiento de la alergia, - consiste en la administración de diversos medicamentos que - inhiben la liberación de mediadores farmacológicos de masto- citos y basófilos, o que bloquean sus efectos. Esta modali- dad terapéutica sólo es un paliativo, pues sólo se tratan los efectos de la enfermedad y no la enfermedad misma.

La inmunoterapia o hiposensibilización, en cambio, cau- sa la formación de anticuerpos bloqueadores de tipo IgG ade- más de un efecto supresor mediado por linfocitos T supreso- res y el desarrollo de tolerancia inmunológica en linfocitos B, precursores de células plasmáticas productoras de IgE. El efecto final es la disminución de los niveles de IgE, evitán- dose así la liberación de los compuestos vasoactivos de mas- tocitos y basófilos.

Como la inyección de los alérgenos intactos para la te- rapia hiposensibilizante, se asocia al riesgo de inducir reac- ciones sistémicas, que ocasionalmente culminan en reacciones anafilácticas, se han realizado muchos intentos en los últi- mos años, para disminuir la potencia de los extractos alérgé- nicos mediante modificación química (109). Tales alérgenos - modificados, pueden tolerarse en cantidades mayores que los - alérgenos no modificados; así se encuentran células alérgé- nicas en derivatos termolábiles, y los niveles de dismi- - nuir selectivamente la liberación de anticuerpos de tipo IgE.

La eliminación de los anticuerpos reagénicos, sin los riesgos que conlleva el uso de los alérgenos no modificados, constituyen la forma ideal de terapia (151).

9.1.1.-ADYUVANTES Y ADSORBATOS.

El empleo de alérgenos no modificados, en emulsiones de aceites y precipitados de alúmina como adyuvantes, provocan la lenta liberación del alérgeno, reduciendo así el riesgo de reacciones locales o sistémicas. Los extractos de pólenes precipitados con alúmina se absorben lentamente, y se pueden administrar grandes dosis en pocas inyecciones, por lo que el tratamiento es de corta duración. Estudios de los efectos de estos extractos precipitados con alúmina, indican que los pacientes tratados presentan una respuesta significativa y cambios inmunológicos positivos hacia la mejoría de la enfermedad. El inconveniente que se presenta es que a veces resultan de dolorosa aplicación (105).

Empleando el adyuvante completo de Freund (ACF) para administrar alérgenos, se observa una producción pobre de IgE. Esto indica la posibilidad de que el ACF, induzca la producción de sustancias capaces de suprimir inespecíficamente la producción de IgE. Tales sustancias se han descubierto en la circulación y son moléculas reguladoras, que actúan selectivamente en una o más fases de la producción de anticuerpos IgE inhibiendo su producción. Este podría ser el mecanismo que explica la acción de los adyuvantes, además de su acción de lenta liberación de los antígenos, para producir una buena -

respuesta inmunoterápica: la producción de anticuerpos IgG -
bloqueadores (98, 206, 207).

En el comercio existe una preparación hecha mediante la
extracción con piridina del material alergénico, seguido de
la precipitación del extracto con alúmina. La extracción del
alergeno con piridina, reduce la alergenicidad considerable-
mente y la alúmina causa la lenta absorción del extracto, -
estimulando la producción de anticuerpos IgG, disminuyéndose
el riesgo de reacciones locales y sistémicas. El principal -
inconveniente, es que la extracción con piridina tiene efectos
variables sobre los alérgenos, lo que afecta la especificidad
del extracto (98).

9.1.2.-ALERGENOS MODIFICADOS QUE AUMENTAN LA PRODUCCION DE IgG.

Otro modo de disminuir las reacciones alérgicas, consiste
en modificar químicamente los alérgenos, reduciendo su aler-
genicidad, mientras se mantiene la necesaria antigenicidad -
para obtener la respuesta inmunológica deseada: la producc-
ción de anticuerpos IgG bloqueadores (127, 180).

El tratamiento de los alérgenos con formaldehído los -
transforma en "alergoides", tal como una toxina se convierte
en toxoide. Podemos definir el alergoide, como un derivado -
alergénico cuya alergenicidad ha sido disminuída en relación
a la que poseía el alergeno sin modificar, mientras que sus
propiedades antigénicas han sido conservadas, por lo que es
capaz de estimular la producción de anticuerpos tipo IgG. Se
han empleado alergoides de pólenes de hierbas y malezas, es-
pecialmente el centeno. Son efectivos y se toleran bien (132).

La polimerización de los alérgenos, mediante el tratamiento con glutaraldehído, permite obtener enlaces cruzados covalentes entre las proteínas del material alérgico, formando agregados solubles que conservan su antigenicidad y reaccionan con los anticuerpos reagínicos contra el antígeno monomérico, e inducen la formación de anticuerpos bloqueadores. Estos alérgenos polimerizados, poseen poca reactividad antigénica, debido a que ocurre la interferencia estérica de los determinantes antigénicos durante el proceso de polimerización, disminuyéndose el número de determinantes antigénicos capaces de reaccionar. No existe evidencia de que se formen nuevos determinantes antigénicos en los polímeros. El peso molecular de los polímeros, varía entre los 200 000 y 20 millones de daltons; el gran tamaño de ellos, permite que permanezcan en la circulación mayor tiempo que los alérgenos no modificados, que se eliminan rápidamente, obteniéndose de este modo una respuesta inmune comparable a la del alérgeno monomérico (83), en un período menor de tiempo y sin los riesgos de reacciones indeseables. En estudios recientes hechos en grupos de pacientes tratados con alérgenos polimerizados, se observó que la producción de anticuerpos bloqueadores IgG aumentaba, disminuía la producción de IgE y la reactividad cutánea era casi nula. Además, sólo se observó una reacción sistémica ligera por cada mil inyecciones y pacientes que no toleraban las dosis de mantenimiento, pudieron hacerla, sin riesgos de reacciones o dolor (84, 109, 156, 205).

Una variante de este método consiste en polimerizar los

alergenos con glutaraldehído y adsorber el polímero en L-tirosina, de la que se libera lentamente. Esta técnica es más popular en Europa que en los E.U.A. Con algunos alérgenos, - la incidencia de reacciones sistémicas, se reduce al punto de que el tratamiento se completa en tres inyecciones en algunos casos (59, 102).

La inmunización directa de las mucosas, por la aplicación del material alérgico para obtener inmunidad local, es una nueva modalidad terapéutica. Tiene la ventaja de que los pacientes, pueden aplicarse ellos mismos las dosis con un simple gotero. Además, las secreciones mucosas son el mejor lugar en que pueden hallarse o situarse los anticuerpos IgG en las alergias respiratorias, previniendo de este modo un ataque alérgico al actuar desde la vía de entrada natural del alérgeno. El empleo de alérgenos no modificados, puede conducir a los mismos síntomas alérgicos de los pacientes que sufren la exposición natural, por lo que para reducir estos efectos colaterales, pueden emplearse alérgenos modificados. Estudios realizados empleando grupos de personas tratadas con extractos nebulizados y grupos control tratados con placebos, demostraron que el grupo tratado con extractos alérgicos, presentó menos síntomas en la época de polinosis, no así los tratados con placebos. No se afectan considerablemente los niveles de IgG y hay poca elevación de anticuerpos IgE, pero se llega a desarrollar mayor tolerancia a los alérgenos naturales (222).

1.3.-MECANISMOS DE LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS IgE.

Lo ideal en la terapia en enfermedades alérgicas, es lograr la eliminación de los excesivos niveles de IgE mediante la supresión de las células plasmáticas productoras de estos anticuerpos. Los logros obtenidos en las investigaciones realizadas en este aspecto, nos indican que el uso de métodos que logren este objetivo, serán comunes en un futuro cercano (105, 106, 107, 108).

Se encuentran en activa investigación, los mecanismos de inmunosupresión de las células B_E , (linfocitos B transformados en células plasmáticas productoras de IgE), mediante la estimulación de linfocitos T supresores (Ts). En la actualidad se sabe, gracias a estudios hechos en ratones, que la regulación de la producción de anticuerpos requiere de (121, 140, 157):

a) la colaboración entre linfocitos T_H (ayudadores) y linfocitos B es un requisito previo a la inducción de la respuesta de producción de anticuerpos al antígeno inductor.

b) los linfocitos B se diferencian en células productoras de anticuerpos.

c) la población de células T, contiene no sólo T_H sino también Ts y células amplificadoras que aumentan los efectos de T_H y Ts.

d) el balance homeostático entre estas diferentes poblaciones de células T, es el responsable del control, magnitud y duración de la respuesta de producción de anticuerpos.

Desde el punto de vista terapéutico, lo ideal es desarrollar métodos inmunológicamente específicos con los alérgenos modificados apropiados, que inclinen el balance entre las diferentes poblaciones de células T, en favor de los linfocitos T₂ y/o permitan la inactivación o eliminación de las células T_H1.

Las reacciones alérgicas, se inician al unirse el alérgeno polivalente a dos anticuerpos IgE vecinos que se hallan fijados a la membrana de mastocitos y basófilos. Si se evita la unión de el alérgeno polivalente a los anticuerpos IgE, se inhibe la perturbación de la membrana de los basófilos y mastocitos que lleva a la liberación de mediadores químicos. Esto puede lograrse mediante el uso de haptenos alérgicos, fragmentos de la molécula alérgica que contienen determinantes alérgicos simples o univalentes (117). Tales compuestos univalentes son capaces de unirse a las regiones Fab de la IgE, inhibiendo estéricamente la combinación de los anticuerpos IgE con el alérgeno ofensor. Además, los fragmentos antigénicos monovalentes, son capaces de suprimir a las células plasmáticas productoras de IgE, ya que al interactuar con los receptores de las células plasmáticas, evitan la interacción con el antígeno polivalente y suprimen la producción de inmunoglobulinas.

Como ejemplos tenemos: el derivado univalente de la penicilina, el pencil-aminocilol-tercil-lisina (PACT), el cual se inyecta en grandes dosis a pacientes sensibles a la peni-

cilina, quienes toleran bien posteriores dosis de penicilina, cuando requieren necesariamente este antibiótico. Los constituyentes de bajo peso molecular, tipo hapteno, presentes en la fracción dializable de los extractos acuosos del polen de ambrosia, son capaces de combinarse con los anticuerpos reagínicos, bloqueando específicamente la unión de los constituyentes de alto peso molecular de ambrosia a los anticuerpos IgE fijados en membranas (105, 106).

Se ha demostrado la supresión de la producción de IgE, empleando bencil-penicilol y 2,4-dinitrofenol conjugados con gamma globulinas isólogas, y con el copolímero de ácido glutámico y D-lisina (d-GL), en perros y ratas (206). Se ha concluido que el mecanismo responsable de este modo de supresión consiste en la eliminación de células B_E específicas para el hapteno administrado, o quizá a la inactivación de estas células por largos períodos, probablemente a través del bloqueo de sus receptores del antígeno, más que a la participación de células T supresoras.

Los anteriores haptenos, conjugados esta vez con alcohol polivinílico, son capaces de inducir la generación de células T supresoras específicas al hapteno; por otro lado, la conjugación de proteínas alergénicas (no haptenos), con gamma globulinas isólogas, alcohol polivinílico o polietilenglicol, suprimen fuertemente tanto las respuestas primaria como secundaria a los respectivos alérgenos, actuando por inducción de la generación de células T_s específicas (118, 119). No se conoce el mecanismo específico mediante el cual estos antígenos

estas modificaciones favorecen la proliferación de células Ts específicas; sin embargo, de conformidad a los actuales conceptos inmunológicos, un antígeno en forma no inmunogénica favorece la proliferación de células Ts, por lo que los antígenos conjugados a acarreadores tolerogénicos como son las gamma globulinas isólogas, d-GL, alcohol polivinílico y polietilénico, se transforman en no inmunogénicos, lo cual satisface este criterio de inducción de células Ts.

En experimentos hechos con ratones, se han empleado alergenos desnaturalizados con urea (95). Específicamente, el antígeno E de ambrasia, que se halla compuesto de dos péptidos: el alfa y el beta, al tratarse con urea, se separan y desnaturalizan. Cuando se elimina el agente que produce el cambio (la urea) mediante diálisis, hay una reagregación de las cadenas y de las propiedades de este antígeno desnaturalizado, que se vuelve no antigénico e inducen una pequeña producción de anticuerpos IgG, además de que son capaces de estimular la proliferación de células Ts cuando se administran en dosis apropiadas, causando así la supresión de la síntesis de IgE; aunque es de proporciones pequeñas para uso clínico, es de interés en futuras investigaciones.

Existe otra teoría respecto al mecanismo como se desarrolla una respuesta alérgica y que implica la activación de el complemento por los alergenos, que poseen grupos E-amino unidos a moléculas de azúcares; tales uniones son factibles de oxidarse con radiación ultravioleta u otro agente oxidante suave. El alérgeno así fotoactivado decrece en su capa-

de la actividad del complemento, en la intensidad de las reacciones cutáneas y en la capacidad de provocar reacciones bronquiales, como se ha observado en alérgenos fotoinactivados de polvo casero, plumas y pelos de animales y humanos. Lo se puede decir lo mismo de extractos de pólenes. Pacientes sensibles al polvo casero, tratados con el alérgeno fotoinactivado, obtuvieron un grado de hiposensibilización comparable a el obtenido con adsorbatos de albúmina, sin mostrar reacciones adversas (27).

9.2.-DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de laboratorio en alergias, implica principalmente el reconocimiento del alérgeno, mediante pruebas cutáneas. Estas pruebas son efectuadas en el paciente (in vivo) y como hemos visto, se presentan a veces numerosos factores que afectan el resultado final de éstas, además de los riesgos que se presentan en pacientes muy sensibles.

El desarrollo de métodos de diagnóstico "in vitro" ha sido una necesidad para los casos en que la prueba "in vivo" no es posible, por lo que a la fecha se han obtenido técnicas muy sensibles y específicas, que eliminan los riesgos e inconvenientes de las pruebas cutáneas.

La técnica "in vitro" de mayor éxito en el diagnóstico de las alergias, ha sido el RAST (radio-allergen-sorbent-test), técnica discutida en el capítulo 7. Se utiliza porque no sólo en que es un análogo "in vitro" de las pruebas cutáneas, sino en su aplicabilidad a otros fines como son la estándar de

ción de extractos alérgicos y la evaluación de los resultados de la inmunoterapia. Además, ha resultado la técnica ideal (después de las pruebas cutáneas), contra la cual se comparan nuevos métodos. Existe una modificación al RAST, que consiste en el empleo de cantidades mínimas de reactivos ("mini RAST"), cuyos resultados son comparables a los de la técnica estándar, pero con la ventaja del ahorro de reactivos (70).

9.2.1.-INMUNENSAYOS DE DESARROLLO RECIENTE.

A continuación se mencionan algunos de los nuevos métodos de detección de IgE, que han surgido en los últimos años.

PTRIA (Poliestirene tube radio immuno assay): es útil en pacientes bajo tratamiento inmunoterápico, ya que se detectan anticuerpos IgE específicos, sin que los anticuerpos IgG producidos durante el tratamiento interfieran en la reacción. En este aspecto aventaja al RAIT, ya que en éste, la capacidad de discriminar entre un tipo y otro de anticuerpos contra el mismo antígeno es limitada. Consiste en tubos de poliestireno cubiertos con IgE de mieloma, seguidos por anti IgE fijadas a los anticuerpos de mieloma, a modo de formar una capa inmunosorbente a la que se añade el suero del paciente y albúmina sérica bovina, de modo que la IgE del suero reacciona con la capa inmunosorbente, fijándose en ella. Entonces se añade el anticuerpo marcado con ^{125}I , que se une a la IgE fijada al inmunoadsorbente; entonces se determina la radiación por un contador gamma, siendo la radiac-

tividad medida proporcional a la IgE presente en el suero del paciente (202).

MSPRIA (Microtitular solid phase radio immune assay): es otro método opcional para determinar IgE, empleando pequeñas cantidades de reactivos y muestras. Los resultados obtenidos muestran un 95% de correlación con el RAST. Consiste en placas de microtitulación con tubos en U, en las que se incuban secuencialmente el antígeno, albúmina, suero del paciente y la anti IgE marcada con I^{125} . Luego del tiempo de incubación, los tubos de la placa se separan cortándolos, determinándose la radiactividad de cada tubo en un contador gamma, siendo la radiactividad medida proporcional a la cantidad de IgE presente en el suero del paciente. Es un método específico, reproducible y fácil de hacer (173).

Radio inmuno ensayo en fase sólida: en este método se cuantifica la IgE producida en la inmunoterapia, sin que interfiera la IgE presente en el suero del paciente. En microtubos de poliestireno, se añade el extracto alérgico de interés, se evapora a $37^{\circ}C$, constituyendo así la fase sólida del sistema. Estas fases sólidas son muy estables por mucho tiempo, almacenadas en refrigerador. Luego de que añade el suero del paciente, se incuba por varias horas, luego de las cuales se elimina la IgE fijada al antígeno mediante calentamiento (la unión al antígeno es reversible). Luego se agregan anticuerpos anti-

IgG radiomarcados que reaccionan con la IgG fijada al antígeno, siendo proporcional la radiactividad medida - en un contador a la cantidad de IgG presente en el suero. Este método es útil en la evaluación de la inmunerapia (50).

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay): es un método muy sensible para detectar tanto IgE como IgG contra los alérgenos. El antígeno purificado se halla fijado al fondo de un tubo de ensayo, al cual se añade el suero del paciente, seguido por la adición de la anti IgE o anti IgG marcada con una enzima (fosfatasa alcalina), la cual reacciona con la Inmunoglobulina unida al antígeno. El último paso consiste en añadir el sustrato de la enzima (p-nitrofenol fosfato, que es hidrolizado por la enzima), resultando en una reacción colorida (azul). La reacción se detiene con NaOH y se lee espectrofotométricamente a 405 nanómetros. Sólo se requieren mínimas cantidades de suero, del antígeno y además se emplean diluciones altas (170, 184).

RACIA (Particle counting immune assay): es un sistema automatizado para la detección de IgE. Consiste en partículas de látex recubiertas de anti IgE, que actúan como fase sólida con la que reacciona la IgE sérica, aglutinando las partículas de látex. No se requieren sustancias radiactivas, y es un método de gran sensibilidad (127).

Las técnicas de inmunoradiología e inmunofluorescencia se han utilizado en el diagnóstico, pero aún se hallan en fa

de experimental en lo que respecta a la detección de anticuerpos IgE.

9.2.2.-LIBERACION DE HISTAMINA Y DESGRANULACION DE BASOFILOS.

Las reacciones alérgicas dependen no sólo de la IgE circulante, sino también de otros factores como la capacidad de basófilos y mastocitos para liberar mediadores.

La medición del porcentaje de desgranulación de basófilos y de la liberación de histamina, pueden ser una mejor reflexión de la verdadera situación inmunológica "in vivo". Estas determinaciones se hacen "in vitro", empleando sangre total, y aunque realmente no son métodos recientes, en la actualidad se les ha optimizado y mejorado, permitiendo su empleo a nivel de laboratorio.

9.2.2.1.-DETERMINACION DE LA LIBERACION DE HISTAMINA.

La liberación de histamina de leucocitos de individuos alérgicos, es una prueba "in vitro" de hipersensibilidad inmediata. Se inicia por la adición del antígeno a la sangre del paciente, requiere de calcio iónico y se debe a la presencia de IgE fijada a los basófilos circulantes, únicas células de la sangre humana que contienen histamina. La liberación de histamina, es un proceso secretorio modulado por el nivel de AMP cíclico intracelular. Esta prueba es de amplia aplicación en el diagnóstico clínico, pero su empleo como herramienta de investigación, ha sido recompensado de un gran número de nuevos conocimientos acerca de las reacciones de hipersensibilidad inmediata.

Las metodologías comunes para el ensayo de la histamina incluyen: bioensayos en el ileón de cuyno, métodos fluorimétricos, técnicas isotópicas enzimáticas, cromatografía de líquidos a alta presión.

La extracción y ensayo de histamina por el método fluorimétrico es el más empleado. Es muy sensible y seguro para la determinación de esta molécula. Sin embargo, por varias razones, la técnica ha tenido sólo limitada aplicación clínica:

- a) se requieren grandes cantidades de sangre.
- b) El método es técnicamente complicado.
- c) La extracción de histamina y el ensayo fluorimétrico son engorrosos y consumen mucho tiempo.

El método fluorimétrico consiste en el acoplamiento de la histamina, (cuya liberación se induce incubando a 37°C durante 60 minutos la sangre con el antígeno), con orto-ftalaldehído a un pH alcalino, para formar un producto fluorescente. Para eliminar la interferencia de otras compuestas, la histamina se extrae antes de la condensación al *o*-ftalaldehído, precipitando las proteínas con ácido perclórico (72, 135).

Un método desarrollado recientemente sólo requiere de 0.5 ml de sangre, por lo que el paciente puede ser probado contra varios alérgenos con una cantidad limitada de sangre. Correlacionado con las pruebas cutáneas, se ha observado que mientras más fuerte sea la reacción cutánea, mayor será el nivel de histamina en la sangre. La correlación entre el

las tónicas (1951), mientras más débil sea, menor será el porcentaje de correlación (43 a 23%) (149).

Entre las ventajas que tiene la determinación de histamina en sangre, tenemos:

a) La seguridad de la prueba, ya que el paciente no se expone al antígeno.

b) No hay peligro de sensibilizar al paciente o de fomentar una respuesta inmune como pudiera ocurrir con repetidas pruebas cutáneas.

d) Son estudios cuantitativos, ya que se estudia la concentración de antígeno que libera el 50% de histamina.

e) Permite el uso de antígenos no purificados o que no se pueden emplear clínicamente.

f) Sirve como medida de los anticuerpos bloqueadores desarrollados en la inmunoterapia.

La liberación de histamina en sangre, es un índice biológico más sensible y exacto de la sensibilización de el paciente y puede indicar la interrelación existente entre los diferentes anticuerpos y los mecanismos de control celulares de liberación de histamina.

Recientemente se ha desarrollado una metodología de determinación de histamina en orina (145). Aproximadamente el 1% de la histamina plasmática, se excreta intacta por el riñón. La mayor parte es metabolizada por la enzima N-metiltransferasa (el sistema preferido) o por la diaminooxidasa (146). Sin embargo, esa pequeña porción que es eliminada por el riñón y excretada intacta en la

orina, permite el análisis de la fluctuación de la histamina plasmática. Tiene diversas ventajas sobre la histamina plasmática: relativa estabilidad, fácil accesibilidad, y la oportunidad de análisis retrospectivo. Inicialmente se desarrolló el análisis de histamina en orina, para analizar el rol de mastocitos e histamina en varios estados de salud y enfermedad. La extracción de la histamina, se realiza mediante cromatografía de intercambio iónico, empleándose el método fluorimétrico para la determinación, ya que es un proceso accesible y automatizado, además de que se contaban con valores normales previamente publicados (145).

En resumen, la liberación de histamina es un complemento útil para la evaluación clínica de los pacientes y puede funcionar como una alternativa "in vitro" bajo ciertas condiciones. La automatización del proceso le confiere rapidez, reproducibilidad, sensibilidad y una menor cantidad de muestra.

9.2.2.2.-DESGRANULACION DE BASOFILOS.

Explora la sensibilidad alérgica a nivel celular, a través de la sensibilización dependiente de la IgE en el basófilo (21). Esta prueba se basa en un método específico de tinción, en un caso de los basófilos sanguíneos. La muestra de sangre se expone al antígeno a que es sensible el paciente y una muestra control se deja sin exposición al alergeno. Entonces se tiñen los basófilos con la simple mezcla de la sangre con una solución de azul

de toluidina que lisa los eritrocitos, fija los leucocitos y tiñe los basófilos metacromáticos. Los basófilos expuestos al antígeno, se desgranulan, y no se tiñen, por lo que el porcentaje de desgranulación se expresa:

$$\frac{\text{Número de basófilos en el control} - \text{Número de basófilos en la prueba}}{\text{Número de basófilos en el control}} \times 100$$

Los antígenos empleados son de una amplia variedad, por ejemplo, polvo de casa (51).

Las pruebas diagnósticas basadas en el estudio de células efectoras (basófilos), exploran 3 importantes parámetros:

- a) La producción de IgE.
- b) La fijación de la IgE a la membrana del basófilo.
- c) La capacidad de la célula en desgranularse en presencia del alérgeno.

El RAST sólo explora el primer parámetro, las pruebas cutáneas incluyen además la reactividad vascular, pero no es una prueba totalmente inocua.

La desgranulación de basófilos es una técnica poco usada en el laboratorio, debido a su complejidad y variabilidad en el proceso de conteo, aunque esto puede evitarse empleando métodos automatizados (145). Como técnica de investigación es útil, y su optimización permitiría su empleo a nivel de laboratorio.

CAPITULO 10

"ESTUDIO DE LOS POLENES
Y HONGOS ATMOSFERICOS"

ESTUDIO DE LOS POLENES Y HONGOS ATMOSFERICOS.

De las partículas que pululan en el aire, y que causan trastornos de tipo alérgico, los pólenes y las esporas de los hongos figuran entre las más importantes.

En el estudio del enfermo alérgico resulta de gran utilidad el conocimiento de la flora alérgica de la región, su distribución y abundancia, ya que este dato, asociado a la historia clínica, puede conducir al diagnóstico presuntivo del aeralergeno incriminado.

10.1.-POLENES.

El estudio de los pólenes presentes en la atmósfera a lo largo de las diferentes estaciones del año, permite conocer las fluctuaciones a que se ven sujetos y así determinar las épocas en que son más abundantes y que generalmente coinciden con la presentación de los síntomas en el paciente alérgico.

10.1.1.-ESTUDIO DE LOS POLENES.

Los granos de polen son las células germinales masculinas, producidas en el androceo o componente masculino de las flores de las plantas fanerógamas. El androceo se compone de una o varias piezas llamadas estambres que constan de un filamento y una parte superior escultada llamada antera, en cuya cavidad se producen los granos de polen. Cuando las anteras maduran, salen los granos de polen de los sacos polínicos (33, 134, 228, 229).

Estructuralmente, los granos de polen consisten de -

las siguientes partes:

a) La exina, o cubierta protectora, que puede ser rugosa, lisa o espiculada, etc. En ella se aprecian poros germinales. Está compuesta de una sustancia muy durable llamada esporopollenina, que es un polímero de alto peso molecular formado de ácidos grasos.

b) La intina, es la membrana interna limitante, de espesor variable, compuesta de celulosa.

c) La fovila, masa coloidal central en la que se encuentran dos núcleos haploides, el generador y el vegetativo, además de estructuras subcelulares como retículo endoplásmico, ribosomas, etc., y pigmentos, vitaminas, enzimas y 2 hormonas de crecimiento vegetal, el ácido indolacético y la giberelina.

Al ponerse en libertad el polen, necesita de vectores que aseguren su transporte a los órganos femeninos de la flor (gineceo), en el cual la fovila empieza a hidratarse y dilatarse, creando una hipertensión en el grano de polen, que en un momento dado vence la cubierta protectora por un poro germinal, emergiendo un tubo polínico en el que se hallan los núcleos generador y vegetativo. El tubo polínico se labra camino en el gineceo hasta el óvulo, mediante la actividad enzimática que desarrolla, fecundándolo.

Los vectores que transportan el polen son diversos:

1) Agua (hidrofilia).

2) Animales (zoidofilia).

a) Por insectos (entomofilia).

b) Por moluscos (malacofilia).

c) Por pájaros (ornitofilia).

d) Por murciélagos (quiropterofilia).

3) Viento (anemofilia).

El polen de las plantas zoidófilas, se encuentra en flores aromadas y de apariencia exquisita, lo que resulta atractivo a los animales; además son grandes, de superficie espiculada y rugosa, y con aceites que permite que se adhieran al vector. Se produce en poca cantidad y es de escasa o nula importancia en las enfermedades alérgicas.

El polen anemófilo, se encuentra en plantas que poseen flores de escaso atractivo para los animales, por lo que para asegurar la fecundación, el polen se produce en grandes cantidades y son pequeños y livianos, secos, por lo que fácilmente se difunde con el viento. La polinización o fecundación, se asegura porque las las hojas que podrían retener granos de polen, aparecen luego de la flor y porque el gineceo se desarrolla en forma plumosa y capta con facilidad el polen. El polen anemófilo es un alérgeno inhalable cuyo órgano de choque son las vías respiratorias.

Este carácter de la planta constituye uno de los postulados de Thommen, los cuales establecen el mayor o menor poder alérgico de una planta (33, 228):

1.- Una planta para ser considerada alergógena, debe ser productora de polen que contenga propiedades excitantes desde el punto de vista clínico.

2.- Debe ser anemófila.

3.- Debe producir polen en grandes cantidades.

4.- Sus granos de polen, deben ser ligeros para poder ser transportados por el aire a distancias considerables.

5.- Deben ser plantas abundantes y de distribución amplia en el lugar de estudio.

10.1.2.- MUESTREO DE LOS POLENES.

El muestreo aerobiológico tiene dos objetivos: la identificación de los granos de polen y la determinación de la concentración de ellos en un área geográfica determinada (32, 33, 146, 199, 228).

La base de todos los métodos, consiste en el empleo de una superficie sobre la cual se adhieran los granos de polen, generalmente se trata de portaobjetos cubiertos de petrolato, cemento plástico o glicerina. En nuestro medio, usamos gelatina con verde de metilo (Jalea de Brandt), de la que se coloca una gota en el centro del portaobjetos. La laminilla así preparada, se expone a la atmósfera durante 24 horas. Para protegerla de la lluvia, el sol y otros factores climáticos, puede emplearse un dispositivo formado por una tira de material, a manera de túnel, una lámina suspendida en los extremos, para permitir que el viento circule libremente. El día

positivo de Durham cumple los mismos propósitos, y consta de dos placas circulares separadas 3 pulgadas, en cuyo centro se halla una base para colocar la laminilla.

Este método se basa en el depósito de los granos de polen por acción de la gravedad, aunque el fluir del viento, más que la acción gravitatoria, es lo que permite el depósito de partículas en la laminilla. Al aumentar la velocidad del viento, se mejora la eficiencia en la captura de partículas pequeñas. Orientando el eje mayor de la laminilla con la dirección del viento, se aumenta también el número de partículas capturadas.

Después de la exposición al ambiente, se calienta la laminilla y se coloca sobre el lugar que tiene la gelatina un cubreobjetos y se procede a la observación microscópica, empleando el objetivo seco débil (10x). La cuenta de pólenes, se expresa como el número de granos de polen por centímetro cuadrado, contando el número de pólenes bajo la superficie del cubreobjetos, (que puede medirse) y transformarla al número de pólenes por 1 cm^2 . Este dato también puede relacionarse con el tiempo de exposición (granos de polen/ cm^2 /hora). Puede emplearse también un hemacitómetro, una regla calibrada u otro dispositivo para tales propósitos.

En ocasiones resulta difícil la identificación de algunos granos de polen, sobre todo al principiante en el estudio, por lo que es recomendable la tinción, empleando la tinción de tolberla, que se añade a la glic

rina se se añade al portaobjetos pocos minutos antes de hacer el exámen microscópico. Esto expande los granos de polen, los colorea de rojo y cambia sus propiedades refractivas para hacer sus estructuras fácilmente identificables.

La gelatina de Brandt se prepara de la siguiente manera: Humedecer gelatina comercial con agua 2 o 3 horas. Eliminar entonces el exceso de líquido y calentar para fundir. A una parte de la gelatina fundida, se le agrega parte y media de glicerina caliente, se filtra la mezcla a través de una gasa colocada en un embudo, procurando mantenerla fluída con calor. Se añade entonces 2 o 3% de fennil y a ésto, gota a gota, una solución de verde de metilo en alcohol (50%) hasta obtener una mezcla homogénea color verde. La gelatina así preparada, se guarda en refrigeración. Cuando se emplee se funde en baño maría.

La tinción de Calberla se compone de: glicerina (5 ml), alcohol de 95% (10 ml), solución saturada de fuchsina (0.02 ml, aproximadamente 2 gotas), y agua destilada (15 ml).

10.1.3.-CLASIFICACION DE LOS POLENES.

Para la clasificación de los pólenes deben tenerse en cuenta las siguientes características que los distinguen (168, 199, 228):

- a) Tamaño: oscila entre 16 y 100 micras.
- b) Forma: oval, redonda, triangular, poliédrica, etcétera.

c) Superficie: la exina puede ser lisa, rugosa, espiculada, reticulada, granulosa, con surcos, etc.

d) Póros germinales: pueden ser, de acuerdo al número: monocolpados, dicolpados, tricolpados, etc.

e) Color: es de relativa importancia, puesto que con el tiempo suelen cambiar de color; también se relaciona con el lugar de donde provienen (en zonas industriales son más oscuros).

Se debe considerar que la existencia de diversas especies consideradas alergógenas, varían con las condiciones geográficas como el clima, la altitud, etc., que es lo que determina la vegetación de un lugar y por lo tanto la presencia de determinados pólenes en la atmósfera.

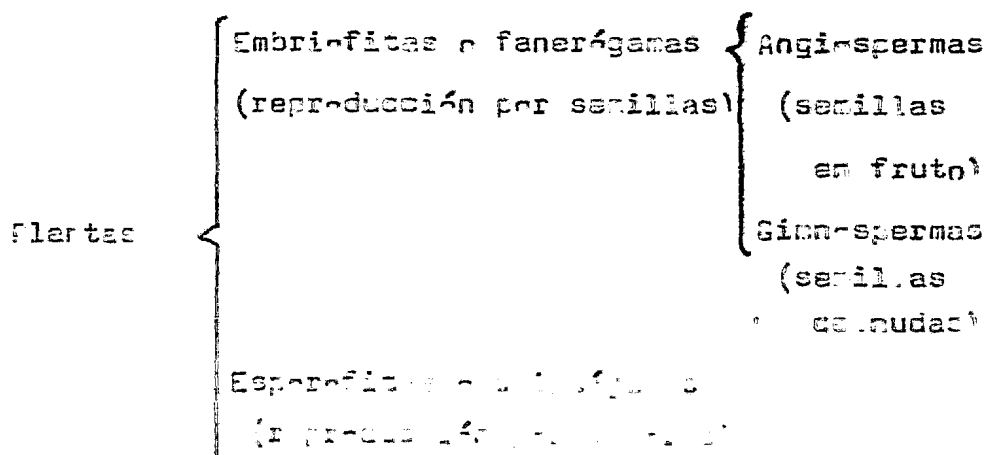
Los factores climáticos como la lluvia, la velocidad del viento, la temperatura, influyen en la permanencia del polen en la atmósfera. Por ejemplo: la lluvia nocturna moderada ayuda a la maduración de los granos de polen, dando lugar a que sean liberados en grandes cantidades; en cambio, la lluvia diurna fuerte, dificulta la permanencia en el aire de los granos de polen. En cambio, la velocidad del viento, junto con el tamaño del polen y su velocidad de caída, determinan que el polen pueda permanecer en el aire y la distancia a que pueden ser transportados. Un aumento en la temperatura determina una mayor actividad celular, lo que da lugar

a un aumento de la producción de polen y en consecuencia una mayor proporción de ellos en la atmósfera.

Sin embargo, aun una misma región pueden darse variaciones año tras año de los pólenes existentes, debido a el incremento en el cultivo de algunas especies o a la introducción de nuevas plantas.

Aunque clínicamente no se ha determinado la cantidad de polen en la atmósfera capaz de producir las manifestaciones alérgicas, puesto que algunos pacientes presentan reacciones con bajas cantidades y otros cuando la polinosis es mayor, el conocimiento de el inicio de las épocas de polinosis y sus etapas de mayor concentración en la atmósfera, son de ayuda tanto en el diagnóstico, como en el período adecuado de iniciar el tratamiento hiposensibilizante.

De gran ayuda resultan las consideraciones botánicas y taxonómicas de las plantas productoras de pólenes (228, 229):



Las plantas de nuestro interés son las fanerógamas. Pueden ser dicicas (que contienen pistilo y estambres - en diferentes plantas) o monoicas (que contienen pistilo y estambres en la misma planta). Las gimnospermas, se caracterizan por el hecho de que sus óvulos se hallan más bien en conos que en flores; a ella pertenecen las coníferas. Las angiospermas pueden ser monocotiledóneas o dicotiledóneas, contienen sus semillas en ovarios cerrados y son la mayoría de las plantas alergénicas. Las gimnospermas arrojan a la atmósfera gran cantidad de polen, pero no son de gran importancia alergénica.

Taxonómicamente podemos distinguir las plantas alergénicas en árboles, pastos y malezas.

Otra clasificación, según Jiménez Díaz, se basa en la forma del polen (33); se dividen en cuatro grupos:

I.-Pólenes de gramíneas: de forma esférica u oval, sin accidentes notables en su exina y con una sola apertura germinal en forma circular. Generalmente son menores de 30 micras y se tiñen de azul fácilmente con el yodo debido a su alto contenido de almidón.

II.-Pólenes de amarantáceas y quenoquidáceas: son redondeados y con abollamientos en su exina, con numerosas ranuras germinales que le dan aspecto de pelota de golf, - sin espinas; apenas se tiñen de azul con el yodo.

III.-Pólenes de conquectas: polen referencial, con estrias muy prominentes, de pared gerinal múltiple; apenas tapan el yodo, causa una coloración rosada.

IV.-Pólenes de frutales: ...

particular, que caracteriza a cada uno de ellos.

Taxonómicamente, el grupo II y III se hallan en el grupo de las malezas.

10.2.-DESCRIPCIÓN DE LOS PRINCIPALES POLENES HALLADOS EN MÉXICO.

Se presenta un esquema breve de la clasificación vegetal de las plantas alergénicas, siguiendo la división taxonómica de pastos, malezas y árboles (32, 33, 41, 44, 228, 229).

10.2.1.-PASTOS.

Son angiospermas monocotiledóneas, que consta de 2 familias de importancia alergénica: gramíneas y ciperáceas (las características particulares de cada polen se halla en el cuadro 10.2.1).

I.-Familia de las gramíneas: ocupan el primer lugar entre las monocotiledóneas, y el tercero entre las fanerógamas, con diez tribus o subfamilias y más de 4000 especies. El polen de las gramíneas posee característicamente un solo poro germinal. La mayoría son cultivados, por lo que son prevalentes en zonas habitadas.

Las tribus o subfamilias son las siguientes:

- 1) Panicaceae. Géneros: Paspalum.
- 2) Festuceae. Géneros: Dactylis, Eragrostis, Festuca, Distichlis y Bromus.
- 3) Poaceae. Géneros: Lolium, Agropyron, Elymus.
- 4) Avenae. Géneros: Avena.
- 5) Barcotideae. Géneros: Barcotia, Chloa (cola de

1-1970].

5) Chlorideae. Géneros: Cynodon o Capriola (pata de gallo o grama), Bouteloua (grama azul), Beckmania.

7) Phalaradeae. Géneros: Anthoxanthum, Phalaris (alpiste).

8) Zizaneae. Géneros: Zizania.

9) Andropogoneae. Géneros: Holcus (hierba Johnson), Andropogon.

10) Tripsicaseae. Género: Zea mais (maíz).

II.-Familia de las ciperáceas. Sólo la subfamilia Carex posee importancia alérgica en México.

10.2.2.-HIERBAS O MALEZAS.

Son plantas que crecen silvestres y no tienen valor decorativo ni en agricultura. Son todas angiospermas dicotiledóneas. En general los granos de polen son esféricos, espiculados y con un número variable de poros germinales. Existen 6 familias de importancia alérgica: Compositae, Poligonaceae, Chenopodiaceae, Amarantaceae, Leguminosas y Plantaginaceae (cuadro 10.2.2).

I.-Familia Compositae (o compuestas): es el grupo de malezas más importante desde el punto de vista alérgico. Se caracteriza por sus flores múltiples arregladas en receptáculos comunes. Existen catorce subfamilias o tribus, siendo las más importantes:

1) Helianthe. Géneros: Bidens, Helianthus (girasol) Jasnos (mirasol).

2) Ambrosiaceae. Géneros: Ambrosia (altamisa), Fran-

seria, Xanthium.

3) Anthemideae. Géneros: Artemisa (estafiate), -
Achillea.

4) Astereae. Género: Saccharis (jaras).

II.-Familia Poligonaceae: incluye solamente un gé-
nero de importancia alergénica: Rumex (lengua de vaca).

III.-Familia Chenopodiaceae: sólo dos géneros de im-
portancia: Chenopodium (epazote) y Atriplex.

IV.-Familia de las Amarantaceae: sólo un género de
importancia: Amaranthus (quelite).

V.-Familia de las leguminosas: una subfamilia con
un género importante: Papilionadae. Género: Medicago (al-
falfa).

VI.-Familia de las plantagináceas. Un género de im-
portancia: Plantago (lantén).

10.2.3.-ARBORES.

Pueden ser angiospermas o gimnospermas. Las gimnos-
permas contienen a la familia de las coníferas, que aun-
que no son de particular interés en alergias, la inci-
dencia de sus pólenes en la atmósfera y la gran canti-
dad de coníferas existentes, hacen pertinente su estu-
dio. Las angiospermas comprenden la mayoría de los árbo-
les alergénicos; son dicotiledóneas. Los pólenes de los
árboles presentan particularidades que los diferencian
fácilmente (ver cuadro 10.2.3.)

a) Gimnospermas. Sólo las coníferas son de impor-
tancia.

I.-Familia de las coníferas. Se les halla en climas templados y se distinguen por sus hojas en forma de agujas. Posee seis subfamilias o tribus, de las que sólo una es de importancia:

1) Subfamilia Abietineae (pináceas). Géneros: Pinus (pino), Cupressus (ciprés), Juniperus (junípero).

b) Angiospermas. Se cuentan 9 familias de importancia:

I.-Familia Salicaceae. Son los sauces o ahuejotes. Posee 2 géneros de importancia: Salix y Populus (álamo o chopo).

II.-Familia Betulaceae. Sólo un género de importancia alergénica: Alnus (aile).

III.-Familia de las Fagaceae. Género: Quercus (encino).

IV.-Familia de las Mimosaceae. Género: Acacia (mimosa).

V.-Familia de las Anacardiaceae. Género: Schinus (pirú).

VI.-Familia de las Oleaceae: Géneros: Fraxinus (fresno), Olea (olivo), Ligustrum (trueno).

VII.-Familia de las Litaceae. Género: Myrtaceae (eucalipto).

VIII.-Familia de las Ulmaceae. Un género: Ulmus (olmo).

IX.-Familia Platanaceae. Género: Platanus.

Existen características de la flora de México que

I.-Familia de las gramíneas (Gramineae).

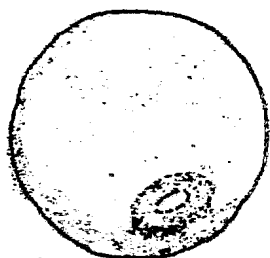
Subfamilia	Género	Espécies	Floración	Características
<u>Panicaceae</u>	<u>Paspalum</u>	<u>P. distichum</u>	Mayo a junio	Esféricas u ovoidales, por germinal de 5.3 m de ϕ
<u>Poaceae</u>	<u>Poa</u> <u>Bromus</u>	<u>P. annua</u> <u>P. compressa</u> <u>B. inermis</u> <u>B. sterilis</u> <u>B. pürgans</u> <u>B. pendulinus</u>	Mayo a agosto	Esféricas, granuladas
<u>Hordeaceae</u>	<u>Agropyron</u> <u>Lolium</u>	<u>A. repens</u> <u>A. macrourus</u> <u>A. furcoides</u> <u>L. perenne</u>	Mayo a junio	Esféricas, con poro germinal de 5.3 m de ϕ Existe cultivado en jardines públicos
<u>Cynodonteae</u>	<u>Cynodon</u> <u>Cynostia</u>	<u>C. pratensis</u> <u>C. alba</u> <u>C. verticillata</u> <u>C. dactyloides</u> <u>C. calcarata</u> <u>C. latifolia</u>	Julio a agosto Inicio de lluvias hasta agosto	40 a 60 m de ϕ , poro germinal de 5.3 m de ϕ saliente Esféricas, 2.5 a 3 m de ϕ , poro germinal de margen cóncavo, de 2.3 a 2.5 m de ϕ textura finamente granular

10.2.1.- F A B T O S

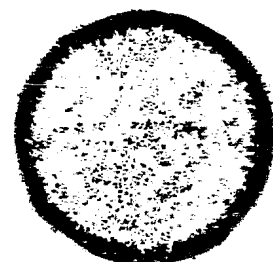
I.-Familia de las gramineas (cont.).

Subfamilia	Género	Subgénero	Floración	Características
<u>Agrostideae</u>	<u>Agrostis</u>	<u>A. mexicana.</u> <u>A. nemmexicana.</u>	Julio a agosto	Esféricos, de 25 a 30 m de ϕ . Aristulados
<u>Chlorideae</u>	<u>Capriola</u> <u>Cyndon</u>	<u>C. dactylon</u>	Mayo a junio, a veces octubre en la mesa Central	Esféricos, de forma variable, 34 a 35 m de ϕ , por geminal circular de bordes ondulados de 5.4 m de ϕ . Aspecto fino y granular. Especie muy extendida en México.
	<u>Dactyloctenium</u>	<u>D. polistachya</u> <u>D. racemosum</u> <u>D. gracillimum</u>	Agosto a septiembre	Esféricos, 24 a 26 m de ϕ , cásculo irregular, por geminal de 3.4 a 3.7 m de ϕ ; aspecto fino y granular.
<u>Chlorideae</u>	<u>Chloris</u>	<u>C. carolinensis</u>	Julio a agosto	Esféricos, de 25 a 30 m de ϕ , por geminal circular de 5.4 m de ϕ . Aspecto fino y granular.
<u>Chlorideae</u>	<u>Chloris</u>	<u>C. l. ...</u>

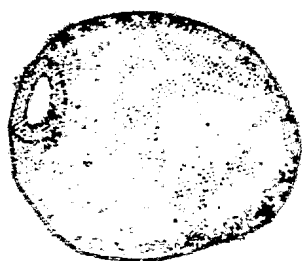
BOLENES DE PASTOS.



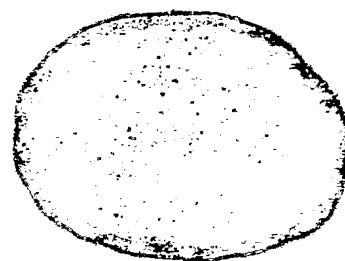
PHLEUM



CAPRIOLA



HOLCUS



ZEA MAIS

12.1.2.- VI ERVAE P I A L E Z A S

I.-Familia Compositae (Compuestas).

Subfamilia	Género	Subgénero	Floración	Características
<u>Helianthe</u>	<u>Bidens</u>	<u>B. leucan-</u> <u>tes</u>	Septiembre a octubre	
		<u>B. grandefl-</u> <u>ra</u>		
		<u>B. tetrag-</u> <u>na</u>		
	<u>Helian-</u> <u>thus</u>	<u>H. annus</u>		Redondos, exina espiculada, de es- piculas agudas. 35 m de ϕ
	<u>Cosmos</u>	<u>Cosmos</u>		Redondos, de 30 m de ϕ . Tricolpatos, surcos altos. Espí- culas prominentes agudas y cónicas. Textura granular; a pesar de ser ente lá- filas, son de gran importancia por su abundancia.
<u>Ambrosieae</u>	<u>Ambrosia</u>	<u>A. elatior</u> <u>A. trifida</u> <u>A. triden-</u> <u>tata</u>	Junio a sep- tiembre	son esféricos u elípticos, de 17 a 21 m de ϕ , tricolpatos o a veces totales

I. Familia Compositae (cont.).

Género	Especie	Descripción	Características
<u>Agropyron</u>	<u>Fraxinea</u>	<u>F. tenuifolia</u> <u>F. deltoidea</u>	Junio a agosto
	<u>Xanthoxylum</u>	<u>X. spinosum</u>	

Características: Presentan varios surcos largos y afilados en los que van incluidos los perispermios. Exina gruesa y granulada, provista de espículas en general cortas, cónicas o redondeadas. A veces sólo presentan vestigios de ellas. Las más frecuentes son las espículas bien desarrolladas y agudas. Cúmulos de 1-2 células de Thomas, pero se encuentran en la corteza de la raíz de la especie mencionada.

19.11. - Urticaceae

I. - Familia Cyperitaceae (cont.).

Subfamilia	Género	Espécimen	Floración	Características
<u>Antiarthideae</u>	<u>Asteriscus</u>	<u>A. vulgaris</u>	Julio a agosto	Esféricos u cilíndricos, de 17 a 20 cm de φ. Con 3 surcos y nervos centrales; exina delgada. Generalmente no espiculados
		<u>A. mexicana</u>		
	<u>Artichia</u>	<u>A. millefolium</u>		
<u>Astereae</u>	<u>Saccharis</u>	<u>Saccharis</u>	Abril a junio	Esféricos o un poco oblongados, de 16 cm de φ, a 32 cm; esinas irregularmente distribuidas. Pueden presentar granos gigantes. No se le reconoce como alergénico

II. - Familia Halimnaceae.

	<u>Halima</u>	<u>H. sericea</u>	Abril a junio	12 a 24 cm de φ, 3 surcos, más frecuentemente 4 y raras veces 5. Base pericarpal en forma de φ. Queda en la base del fruto.
		<u>H. acutissima</u>		

III. - Familia Cyperaceae

III.-Familia Chenopodiaceae.

Subfamilia	Género	Especiario	Floración	Características
	<u>Chenopodium</u>	<u>Ch. album</u>		Locales en la superficie, con margen ligeramente ondulado. Exima granulada, tribaca, con aspecto de pelota de golf.
		<u>Ch. ambrósoides</u>	Junio a julio	22 - de ϕ . Flores de 1.2 m de ϕ regularmente distribuidas, circulares, con márgenes lisos. Flores más pequeñas y menos numerosas que <u>Ch. album</u>
<u>Atriplex</u>		<u>A. senicallata</u>		Esferoidales, de 20 a 27 m de ϕ , flores
		<u>A. muricata</u>		geminales uniformes
		<u>A. bracteosa</u>		en axila y distribución
				de 2 a 1.1 m de ϕ . Ligamento granular. La corolla del pericarpio es talia siempre desfilada.

10.2.3.- V I E R T A S C O N A L E Z A S

IV.-Familia Amarantaceas.

Subfamilia	Género	Subgénero	Floración	Características
	<u>Amaran-</u> <u>thus</u>	<u>A. hybridus</u> <u>A. palmerii</u> <u>A. retrofla</u> <u>xus</u>	Julia a agos ta y mediados de septiembre	23 a 28 m de h, cir culares, de margen ondeado, exina gran ulosa y fina.

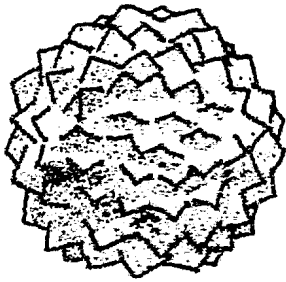
V.-Familia de las Leguminosas.

<u>Papilionadas</u>	<u>Medicago</u>	<u>M. sativa</u>	Marzo a mayo	

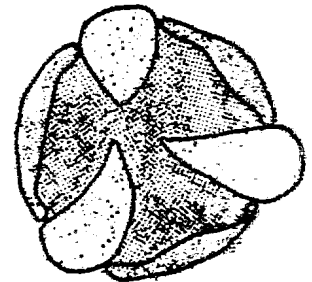
VI.-Familia de las Plantaginaceas.

	<u>Plantago</u>	<u>P. major</u> <u>P. lance-</u> <u>ta</u>	Abril a ju- nio, sobre todo mayo a junio	Esféricoidales, de 15 a 21 m de h. Forma irregular de sus pro ros, membrana gran- ulosa. Exina toscap te verrugosa.

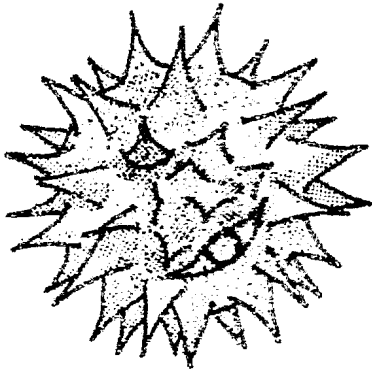
P O L E N E S D E M A L E Z A S .



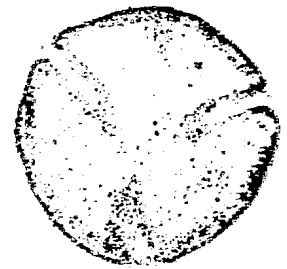
AMBROSIA



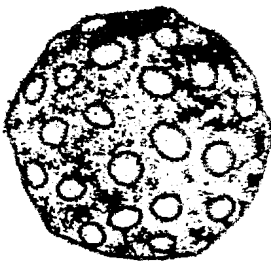
ARTEMISA



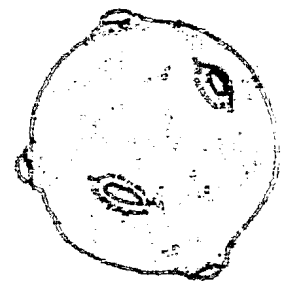
HELIANTHUS



RUMEX



AMARANTHUS



PLANTAGO

3.-Familia de las Coníferas.

Subfamilia	Género	Especie	Floración	Características
<u>Pinaceae</u> (Pináceas)	<u>Pinus</u>	<u>P. ayubae-</u> <u>Quita</u> <u>P. hague-</u> <u>gii</u> <u>P. leucopy-</u> <u>lla</u> <u>P. nigra</u>	Febrero a mayo, pero sus conos se abren todo el año	Abundante en la atmósfera. Se caracteriza por poseer unos grandes y notables vejigones o sacos llenos de aire que les sirven como flotadores que le ayudan a ser transportados por el viento; son más escasos que la exina, que se observa reticulada y granulosa. Su tamaño va de 45 a 65 m de ϕ
<u>Pinaceae</u> <u>Pinus</u>		<u>P. castani</u>	Octubre a febrero. Otros de abril a mayo	Esféricas, 25 a 27 m de ϕ ; exina delgada, sin surcos y un solo poro germinal central
<u>Pinaceae</u> <u>Pinus</u>		<u>P. maritima</u> <u>P. pinaster</u>	Enero	15 a 20 m de ϕ sección horizontal. Exina lisa, gruesa; con un poro central.

10.2.3.- A R B O L E S

IV.-Familia Fagaceae.

Subfamilia	Género	Subgénero	Floración	Características
	<u>Quercus</u>	<u>Q. reticulata</u> <u>Q. crassifolia</u> <u>Q. crassipes</u>	Febrero a abril	Esféricas u oblongas, según el grado de expansión y con tres poros germinales y tres o más surcos; bajo el centro de cada surco hay un centro hialino. Éxina gelada y de aspecto verrugoso y granular. Tamaño entre 20 y 30 m de ϕ

V.-Familia Mimosaceae.

<u>Mimosáceae</u>	<u>Acacia</u>	<u>Acacia</u>	Marzo a agosto	Sus granos están compuestos de 16 elementos: 4 centrales más o menos cuadrangulares o rectangulares, los otros periféricos e incompletos; mide de 45 a 50 m de diámetro

VI.-Familia Urticaceae.

Subfamilia	Género	Subgénero	Floración	Características
	<u>Schinus</u>	<u>S. molle</u>	Marzo a abril	20 a 40 m de ϕ , exina reticulada, tricóspatas, surcos con la raíz germinal levantada sobre la superficie.

VII.-Familia Oleaceae.

	<u>Fraxinus</u>	<u>F. viridis</u> <u>var. baillan</u> <u>deriana</u>	Diciembre a febrero	20 a 25 m de ϕ , de contorno plano y angular, con 3, 4 o 5 sacos germinales. Exina reticulada, no tiene poros.
	<u>Olea</u>	<u>O. europaea</u>		Aplanados, de 22 m de ϕ , con 3 sacos germinales irregulares. Surcos anchos, cortos y vagamente definidos. No cumple los postulados de Thomen y tampoco es alergénico, excepto en cultivadores de oliva

VII.-Familia Cleistanthaceae (cont.).

Subfamilia	Género	Español	Floración	Características
	<u>Ligustrum</u>	<u>L. jarcocai</u>	Marzo a Abril, con mayor vigor de mayo a junio	25 a 30 cm de ϕ , exi- na toscamente reticu- lada con grandes la- gunas. Reticulo que se afina hacia los surcos y desaparece en su margen, cuya membrana es lisa y está provista de un poro germinal forma aplanada

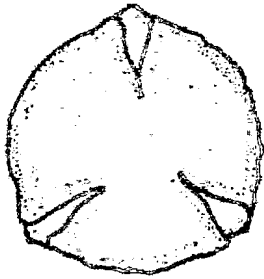
VIII.-Familia Myrtaceae.

Subfamilia	Género	Español	Floración	Características
<u>Myrtáceas</u>	<u>Eucalyptus</u>	<u>E. mandiniana</u>	Enero a ma- yo	Aplanada, contorno irregular, 19 m de ϕ con tres surcos ger- minales, exina lisa

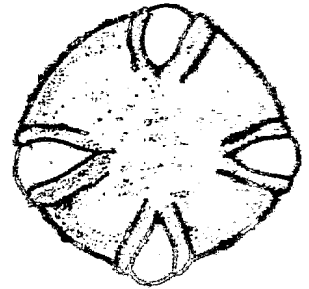
IX.-Familia Ulmaceae.

Subfamilia	Género	Español	Floración	Características
	<u>Ulmus</u>	<u>Ulmus americana</u>	con culti- vados	Oblonga, 25 a 35 cm de ϕ , 3 a 7 nervios exina lisa y reticulada

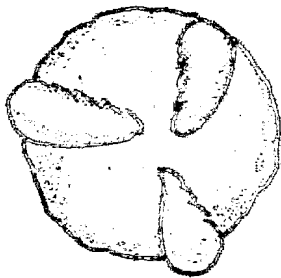
E N R S D E A R B O L E S



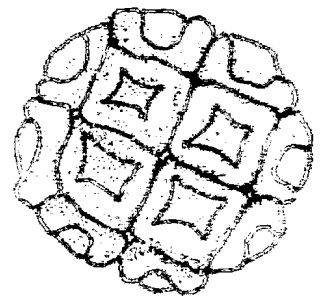
ENCINO
(Quercus)



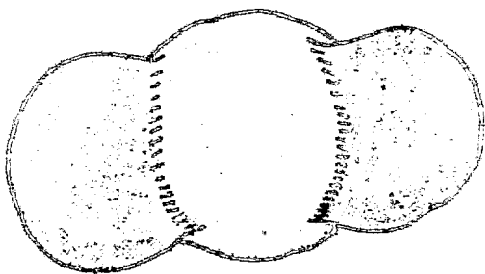
FRESNO
(Fraxinus)



MEZQUITE
(Prosopis)



ACACIA



PINO
(Pinus)



PIRU
(Schinus)

son peculiares y propias. En otros países hay especies - sin importancia alergénica que en México adquieren mayor importancia para figurar entre los factores alergénicos de interés, como veremos enseguida (41, 44, 141, 168, - 181).

Gramíneas de mayor importancia en México: Capriola dactylon, Holcus halepensis.

Malezas importantes en México: Helianthus annuus, - Cnidos.

Árboles importantes en México: Cupressus, Schinus, Acacia.

10.3.-LOS HONGOS.

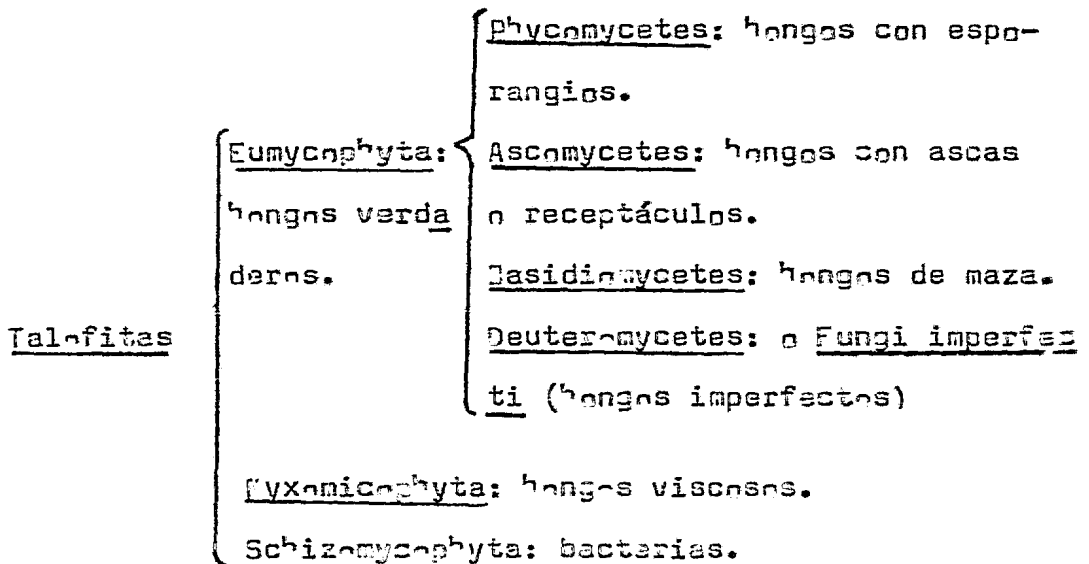
Los hongos atmosféricos, desempeñan un papel de gran importancia en el proceso de sensibilización alérgica. Esto se debe a que la exposición a los hongos es continua, sin estaciones definidas, ya que se les encuentra en todas partes; - no sólo crecen en organismos vegetales y animales vivos o - muertos, sino que pueden crecer, bajo condiciones favorables de humedad, en la tapicería de los muebles, el papel tapiz, la pintura, el polvo casero, sótanos y baños húmedos.

Algunos de los hongos tienen sus propias estaciones y - ecología, pero los hongos del interior de las casas, están - presentes durante todo el año. Por ello, es de importancia - su estudio para determinar qué hongos intervienen en las enfermedades alérgicas (58, 281).

10.3.1.-1 TIPO DE LOS HONGOS.

Los hongos de nuestro interés son los comúnmente denominados mohos, y aunque el término no está definido con precisión, se consideran mohos los hongos pequeños, filamentosos, multinucleados, de apariencia algodonosa y micelio vegetativo. Algunas levaduras son también de interés en alergias.

Taxonómicamente, los hongos son talofitas (sin diferenciación estructural en raíces, tallos y hojas) y los de nuestro interés pertenecen a la rama Eumycophyta u hongos verdaderos:



Las clases Phycomycetes y euteromycetes, engloban a todos los hongos de importancia médica. Los phycomycetes son hongos con esporangios, y sus características, al

cir, que su micelio (organismo) es tubular, multinucleado y sin tabicaciones. Los Deuteromycetes u hongos imperfectos, ocupan en la clasificación un lugar completamente artificial, ya que no se ha descubierto en estos hongos la producción de una fase sexual de reproducción.

La diferencia morfológica principal entre los mohos y los demás hongos es que los aparatos fructíferos de los mohos son filamentosos, mientras que los hongos que no pertenecen a este grupo, como las setas, forman estructuras fértiles carnosas. Las levaduras se incluyen también entre los hongos y son en general organismos unicelulares no filamentosos.

El organismo de los mohos está constituido por el micelio, que es un agregado de filamentos filiformes o hifas, que pueden ser de dos tipos: hifas vegetativas que penetran en el sustrato para absorber las sustancias nutritivas, e hifas fértiles o aéreas, que producen varios tipos de células reproductoras o esporas.

La base de la clasificación de los mohos es el modo de producción de esporas, que pueden ser sexuales o asexuales. Las esporas asexuales se producen en gran cantidad y su función es difundir el hongo. Las esporas sexuales son menos frecuentes y se dan sólo en ciertas circunstancias; su función es estabilizar las razas, controlar la variabilidad y transmitir los caracteres hereditarios a las generaciones sucesivas. Todos los Eu-

mycetes producen esporas sexuales y asexuales, con excepción de los Deuteromycetes, que sólo se reproducen asexualmente.

Tipos de esporas asexuales: conidias, esporangios, zoosporas, artrosporas y oidios. Las conidias se forman aisladas o en cadenas en el extremo distal de las hifas fértiles, el conidióforo, el cual presenta una complejidad variable. Las esporangiosporas se producen en un esporangio o receptáculo, situado en el extremo libre del esporangiífero (hifa fértil). Las artrosporas y los oidios son células sencillas que se desprenden de la hifa y funcionan como esporas. Las esporas sexuales siguen modalidades diferentes en los distintos hongos.

10.3.2.-CULTIVO DE LOS HONGOS.

Crece más lentamente que las bacterias en los mismos medios en que éstas se desarrollan, pero un medio ácido (pH 5.6) con elevada concentración de azúcar, favorece más a los hongos que a las bacterias, por lo que se pueden aislar selectivamente (33, 160, 200).

El medio de Sabouraud es el más conocido para el cultivo de hongos, y el más empleado también; consta principalmente de maltosa y peptona. Casi todos los hongos son aerobios estrictos y crecen en un amplio margen de temperaturas, siendo la óptima entre 22 y 30°C.

10.3.3.-EXAMEN MORFOLÓGICO DE LOS HONGOS.

Como la identificación de los hongos depende en

gran medida de caracteres morfológicos, tales como el tipo de esporas y su disposición, es preciso realizar con gran cuidado las preparaciones destinadas a su observación microscópica. Los cultivos en medios sólidos, especialmente en placa, se examinan superficialmente con una lupa de mano o con el objetivo de poco aumento del microscopio, haciendo un examen tanto del fondo como de la superficie de la placa de agar, de modo de percibir las características de las colonias, cuya superficie puede ser colorida y de aspecto **algodonoso**, pulverulento, húmedo, etc. Muchas veces este examen de orientación, proporciona datos suficientes para identificar el género del mohó. Una inspección más detallada se logra recogiendo con una espátula, una porción del micelio en crecimiento y colocarlo sobre un portaobjetos en cuyo centro se ha puesto una gota de NaOH 1% (aclarar estructuras) y cubriéndolo con un cubreobjetos; de este modo se aprecian las estructuras de esporas y micelio, pero la manipulación desorganiza la conformación del organismo en la mayoría de los casos, por lo que no siempre es posible observar las disposiciones específicas del hongo que permitan su identificación (11, 160).

La mejor manera de identificar y estudiar un hongo, consiste en el cultivo del hongo en una cámara de microcultivo. El dispositivo se puede obtener comercialmente, pero podemos hacerlo sencillamente e incluso como soporte del medio de cultivo un trozo frotado en una cámara

se húmeda una caja Petri con un disco de papel humedecido. Al portaobjetos se le coloca un pequeño cuadro de agar de Sabouraud cortado de una placa, se siembra en las esquinas del cuadro una porción del micelio fungal, se cubre con un cubreobjetos y se incuba en la cámara húmeda. Todo debe realizarse asépticamente para evitar contaminación. Luego de 24 a 72 horas de incubación a temperatura ambiente, puede examinarse en el objetivo de poco aumento del microscopio, sin alterar la estructura del hongo.

10.3.4.-NUESTRO DE LOS HONGOS DEL AIRE.

Las esporas de los hongos pueden cuantificarse del mismo modo que los pólenes, añadiendo como colorante de contraste el azul de algodón (199). Otro método consiste en la exposición durante 5, 10, o 30 minutos, de cajas Petri con agar de Sabouraud, al medio ambiente, que se incuban a temperatura ambiente durante 3 días o más. Entonces se procede a realizar el examen morfológico en la forma antes señalada y al conteo del número de colonias que crecieron. Pueden emplearse otros medios como el agar de papa y dextrosa, o el Czapek Dox. Las ventajas del método en portaobjetos, consisten principalmente en que la exposición es de 24 horas, lo que permite una cuantificación idónea. El método en placa tiene sin embargo, la ventaja de una identificación positiva del hongo, además de la posibilidad de subcultivarlo para realizar otras pruebas cuando no se le ha identificado bien (200).

10.4.-DESCRIPCION DE LOS HONGOS MAS COMUNMENTE HALLADOS.

Estudios realizados en diferentes ciudades de la República Mexicana, indican que los hongos más comúnmente hallados en la atmósfera son: Uromyces, Alternaria, Penicillium, Fusarium, Rhizopus, Phoma, Streptomyces, Chaetomium, - Aspergillus, Cephalosporium, Acrothecium; son prevalentes - en sitios cálidos y húmedos (44).

En los cuadros 10.4, se reportan las características macroscópicas y microscópicas de las colonias de hongos atmosféricos más comunes. La taxonomía de los hongos es la siguiente:

FICOMICETOS: Mucor racemosus, Rhizopus nigricans.

FUNGI IMPERFECTI:

- a) DEMATIACEAE: Alternaria tenuis, Helminthosporium, Uromyces, Nigrospora, Pullularia.
- b) MONILIACEAE: Aspergillus, Monilia, Paecilomyces, Penicillium.
- c) SPHERIACEAE: Phoma herbarum.
- d) TUBERCULARIACEAE: Fusarium.
- e) CRYPTOCOCCEAE: Rhodotorula.

ASCORYCETES:

- a) SACCHAROMYCETACEAE: Saccharomyces cerevisiae.
- b) CHAETOMIACEAE: Chaetomium indicum.

10.4.- *Aspergillus*

<u>Alternaria</u>	Caracteres macroscópicos		
	Color	Anverso	Blanco y después grisáceo
		Reverso	Negresco
	Aspecto	Anverso	Afelpado
		Reverso	Negro, liso.
	Caracteres microscópicos		
<p>Filamentos tabicados, con esporangióforos aislados o en racimos, generalmente no ramificados. - Las conidias tienen forma de masas uniformes, - oscuras. Están unidas a un tubo germinal en forma de cadenas y se originan por gemación del que antecede.</p>			
<u>Aspergillus</u>	Caracteres macroscópicos		
	Color	Anverso	Negro, amarillo verdoso o azulado, según la especie.
		Reverso	Blanco
	Aspecto	Anverso	Algodonoso, pulverulento
		Reverso	Blanco, liso.
	Caracteres microscópicos		
<p>Conidias hialinas - ligeros o de coloración, con esporangióforos ramificados o a veces de un tubo germinal. - Las conidias están unidas a un tubo germinal por gemación.</p>			

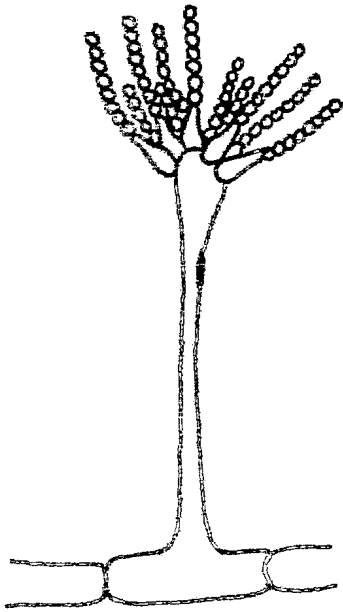
10.4.- " " " " " " .

<u>Hormodendrum</u>	Caracteres macroscópicos	
	Color	Anverso Verde olivo
		Reverso Negro
	Aspecto	Anverso Afelpado
		Reverso Estrellado, rompe el medio
	Caracteres microscópicos	
Hifas con esporóforos levantados, que en su extremo sostienen cadenas ramificadas de conidias ovales o redondeadas (aspecto de nopal).		
<u>Monilia</u>	Caracteres macroscópicos	
	Color	Anverso Salmón
		Reverso Blanco
	Aspecto	Anverso Afelpado, pulverulento
		Reverso Liso, blanco.
	Caracteres microscópicos	
Conidióforos poco diferenciados del micelio; éste se fragmenta originando antrósporas en cadena.		
<u>Mucor</u>	Caracteres macroscópicos	
	Color	Anverso Blanco o grisáceo
		Reverso Blanco
	Aspecto	Anverso Algodonoso
		Reverso - -
	Caracteres microscópicos	
Micelio continuo sin estalones ni rizoides, se reproduce por esporangios en los que se alojan conidias redondeadas.		

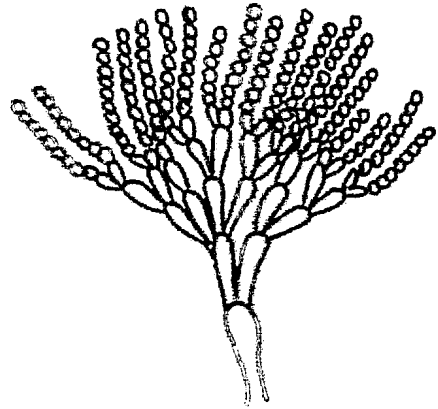
10.4.- Microfungos

<u>Penicillium</u>	Caracteres macroscópicos		
	Color	Anverso	Peniciliosos diversos de verde
		Reverso	Blanco
	Aspecto	Anverso	Algodonoso, afelpado o pulverulento.
		Reverso	Blanco.
Caracteres microscópicos			
Conidias redondeadas en cadenas no ramificadas, insertadas en el extremo del conidióforo de tallos ramificados, dando aspecto de pincel.			
<u>Paecilomyces</u>	Caracteres macroscópicos		
	Color	Anverso	Amarilla morena
		Reverso	- -
	Aspecto	Anverso	Pulverulento
		Reverso	Blanco
Caracteres microscópicos			
Se observan cadenas de conidias ovales, no ramificadas que nacen de esterigmas en forma de botella, encorvadas hacia afuera del eje del conidióforo. Se disponen en racimos al extremo del conidióforo; a lo largo de éstos presentan macrosporas.			
<u>Hizopus</u>	Caracteres macroscópicos		
	Color	Anverso	Blanco o amarillento
		Reverso	Igual al anverso
	Aspecto	Anverso	Algodonoso y compacto
Reverso		- -	

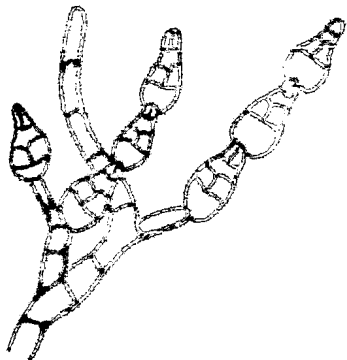
<p><u>Rhizopus</u></p>	<p>Caracteres microscópicos</p>	
	<p>Ficelio continuo provisto de setones, rizoides que le permiten fijarse al medio. Esporangióforos en grupo, como arbustos, globulares.</p>	
<p><u>Streptomyces</u></p>	<p>Caracteres macroscópicos</p>	
<p>Color</p>	<p>Anverso</p>	<p>blanco grisáceo</p>
	<p>Reverso</p>	<p>blanco</p>
<p>Aspecto</p>	<p>Anverso</p>	<p>Afelpado</p>
	<p>Reverso</p>	<p>- -</p>
	<p>Caracteres microscópicos</p>	
	<p>Ficelio delgado, de una micra o menos de grueso, no tabicado. Conidias pequeñas y redondeadas que se disponen en forma de espiral.</p>	



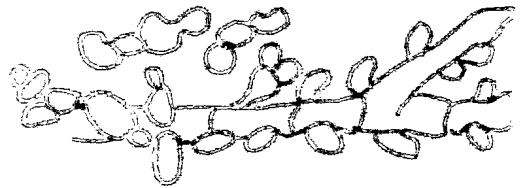
ASPERGILLUS



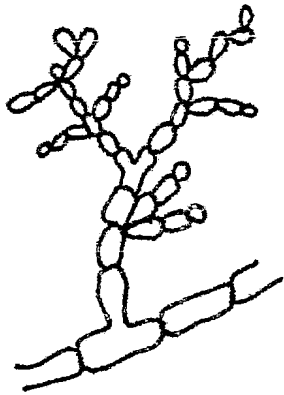
PENICILLIUM



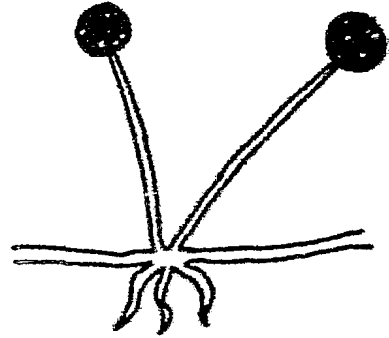
ALTERNARIA



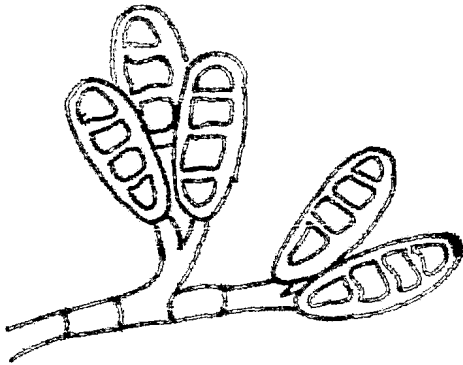
CANDIDA



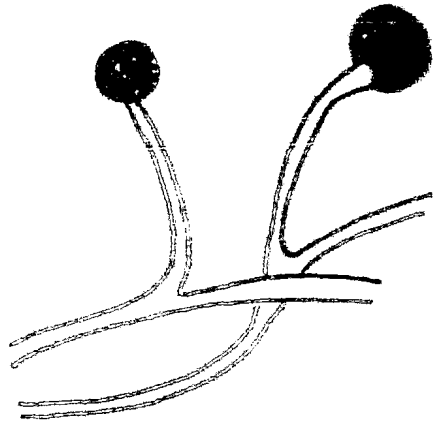
HORMODENDRUM



RHIZOPUS



HELMINTHOSPORIUM



MUCOR

B I B L I O G R A F I A . -

B I B L I O G R A F I A .

- 1.-Aas, K.: Advances in allergen chemistry. Definitions of some terms and conditions. En: Allergy and Clinical Immunology, editado por: E. Mathov, T. Sindo y P. Naranjo, página 149, Excerpta Médica, Amsterdam, 1976.
- 2.-Aas, K.: The diagnosis of hypersensitivity to ingested foods. Reliability of skin prick testing and the RAST. Clin Allergy, 8(1):39, 1978.
- 3.-Aas, K., Lundkvist, U.: The RAST with a purified allergen from codfish. Clin Allergy, 3:255, 1973.
- 4.-Anderson, M.C., Baer, P.: Antigenic and allergenic changes during storage of a pollen extract. J Allergy Clin Immunol, 69:3, 1982.
- 5.-Arbesman, C.E., et al: Measurement of serum IgE by a one-step single radial radiodiffusion method. J Allergy Clin Immunol, 49:72, 1972.
- 6.-Arbesman, C.E., et al: The allergic response to stinging insects. VIII: Fractionation of whole body and venom sac extracts of yellow jacket. J Allergy, 38:1, 1966.
- 7.-Archer, R.K.: The eosinophil leukocyte. Philadelphia, F.A. Davis Co., 1963.
- 8.-Austen, F.K.: Chemical mediators originating from human mast cells: a commentary. Clin Allergy, 10:477, 1980.
- 9.-Baldo, S.A., et al: Allergens from plantain (Plantago lanceolata). Studies with pollen and plant extracts. Int Arch Allergy Appl Immunol, 56(4):295, 1982.

- 10.-Bask, S.A., et al: Appraisal of skin test with food extracts for diagnosis of food hypersensitivity. Clin Allergy, 8(6):559, 1978.
- 11.-Barnett, H.L.: Illustrated genera of Imperfect fungi. 2nd edition, Burgess Publishing Co, Minneapolis, 1960.
- 12.-Barr, S.E., et al: A double blind study of the effects of bacterial vaccine on infectious asthma. J Allergy 36: 47, 1965.
- 13.-Barr, S.E.; Insect allergy to hymenoptera stings. Review of the world literature. 1953-1970. Ann Allergy, 29:41, 1971.
- 14.-Beaven, M.A.: Histamine. N Eng J Med, 249:30, 320, 1976.
- 15.-Becker, E.: Chemotaxis. J Allergy Clin Immunol, 66(2):97 1980.
- 16.-Becker, E.: Nature and clasification of immediate type - allergy. Adv Immunol, 13:267, 1971.
- 17.-Selin, L.: Immunological annalysis of birch pollen antigens, with special reference to the allergenic components. Int Arch Allergy Appl Immunol, 42:300, 1972.
- 18.-Bennich, H., Von Bahr, B., Lindstrom, H.: Structure of - IgE. Prog in Allergy, 1:49, 1974.
- 19.-Bennich, H., Johansson, S.G.O.: Structure and function - of human IgE. Adv Immunol, 13:1, 1971.
- 20.-Bennich, H., Johansson, S.G.O.: Studies of a new class - of immunoglobulins. En: Gamma-globulins, structure, and control of biosintesis. Killanders editors, Stockholm, - 1967, Wiskel Editorial, pag. 192.

- 21.-Benveniste, J.: The human basophil degranulation test as an in vitro method for the diagnosis of allergies. Clin Allergy, 11:1, 1981.
- 22.-Benveniste, J.: PAF, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. Nature, 249:581, 1974.
- 23.-Berg, T., Johansson, S.G.O.: IgE concentrations in children with atopic diseases. Int Arch Allergy Appl Immunol 36:219, 1969.
- 24.-Bernstein, I.L., et al: In vitro cross-allergenicity of major aeroallergenic pollen by the RAST technique. Jour Allergy Clin Immunol, 57:141, 1976.
- 25.-Berrens, L., et al: Complement consumption in eggwhite and fish sensitivity. Clin Allergy, 11:101, 1981.
- 26.-Berrens, L., Van Rijswijk-Verbeek, J.: Inactivation of complement in human serum atopic allergens. Int Arch Allergy Appl Immunol, 45:30, 1973.
- 27.-Berrens, L., Hénoq, E., Adermecker, M.: Photo-inactivated allergens. Clin Allergy, 3:449, 1973.
- 28.-Blumenthal, M.N., et al: Immunogenetics of atopic diseases. J Allergy Clin Immunol, 65(6):406, 1980.
- 29.-Bonilla-Soto, O., Rose, N.R., Arbesman, C.E.: Antigenic properties of *Alternaria tenuis*. J Allergy, 32:246, 1961.
- 30.-Brigthon, W.D., Topping, K.D., Hénoq, E.: Activity units for allergen extracts. Clin Allergy, 9:592, 1979.
- 31.-Broy, H.P., Thontrey, Su, Thontrey, S.: Prick testing -- for allergen standardized by using a precision needle. Clin Allergy, 11:95, 1981.

- 32.-Brown, G.T.: Pollen slide studies. Charles C. Thomas, Publisher. Illinois, 1949.
- 33.-Camacho Borbolla, G.: Estudio de los pólenes y hongos de la atmósfera de la ciudad de México como ayuda en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades de tipo alérgico. Tesis Fac. de Ciencias Químicas, UNAM, México, 1947.
- 34.-Ceska, M., Lundkvist, U.: A new and simple radioimmunoassay for the determination of IgE. *Immunochemistry*. 9: 1021, 1972.
- 35.-Coca, A.F.: Studies in specific hypersensitivity. *J Immunol*, 7:163, 1922.
- 36.-Cooke, R.A., Stull, A.: The preparation and standardization of pollen extracts for the treatment of hay fever. *J Allergy*, 4:87, 1932.
- 37.-Colman, R.W., et al: The kallikreinogen-kallikrein enzyme system of human plasma. *Ann Intern Med*, 71:763, 1969.
- 38.-Cooke, R.A.: Allergy in theory and practice. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1974.
- 39.-Coutiño Bello, B.: Importancia de los hongos en las alergias de tipo respiratorio y su estudio en México. *Bol Soc Mex Mic*, 13:215, 1979.
- 40.-Cueva, J.: El recuento de eosinófilos en el asma. *Alergia* 10:268, 1962.
- 41.-Cueva, J.: Flora y pólenes alergénicos en la República Mexicana. *Rev Med Hosp Gral.*, 31(10):743, 1968.
- 42.-Cueva, J.: Proteasa urinaria y actinodermia. *Rev Med Hosp Gral.*, 8:546, 1948.
- 43.-Cueva, J.: Vacuna intravenosa bacteriana en el asma crónica

- quial. Medicina, No. 645, Feb de 1952.
- 44.-Cueva, J.: Regional problems in bronchial asthma in México. Allergy Clin Immunol, pág. 349, Excerpta Medica International. Proceedings of IX International Congress of Allergology, Buenos Aires, 1976.
- 45.-Chua, Y., et al: "In vivo" and "in vitro" correlates of food allergy. J Allergy Clin Immunol, 58:299, 1976.
- 46.-Dagie, H., Lewis, H.: Hematología práctica. Ed. Toray, - Barcelona, 1973.
- 47.-Damas Mora, M.: Pasado y presente de la alergia. Memorias del IV Congreso Latinoamericano de Alergia e Inmunología México, 1972.
- 48.-Dandeu, J.P., et al: Antigens and allergens in Dermatophagoides farinae mite. II Purification of AG #1, a major allergen in Dermatophagoides farinae. Immunol, 46(4): 679, 1982.
- 49.-De Carolis, C., et al: Complement activation by Hymenoptera venom allergenic extracts. J Allergy Clin Immunol, 70(3):219, 1982.
- 50.-Delepesse, G., Debisschol, M.J., Famment, J.: Measurement of IgG antibodies to house dust mite and grass pollen by a solid phase radioimmuno assay. Clin Allergy, 9: 503, 1979.
- 51.-Dry, J., Leynadies, F., Luce, H.: human basophil degranulation in dermatophagoides allergies: 93 cases. Ann Allergy, 44:303, 1980.
- 52.-Dutton, L.O.: Tinción de eosinófilos en moco nasal. Ann Allergy, 4:138, 1946.
- 53.-Elsayed, S., et al: The allergenic structure of allergens

- from cod. *Int Arch All Appl Immunol*, 52:59, 1976.
- 54.-Eriksson, N.E., Staffan, A., Belin, L.: Diagnosis of reaginic allergy with house dust, animal dander, and pollen allergens in adult patients. I. Comparison between RAST skin test and provocation tests. *Int Arch All Appl Immunol*, 52:335, 1976.
- 55.-Evans, A.C.: A buffered physiologic salt solution. *J Inf Diseases*, 30:95, 1922.
- 56.-Fahey, J.L., McKelvey, E.M.: Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody agar plates. *Immunology*, 94:84, 1965.
- 57.-Findlay, S.R., et al: Contractile events induced by LTD4 and histamine in smooth muscle- a function of Ca^{2+} utilization. *Am J Physiol*, 243(3):C133, 1982.
- 58.-Fleirs, H. Urinary substances provoking allergic reactions. *Brit Jour Dermat*, 73:310, 1961.
- 59.-Fourcard, T., Johansson, S.G.O.: Immunological studies - in vitro and in vivo of children with pollenosis given immunotherapy with an aqueous and glutaraldehyde-treated tyrosine-adsorbed grass pollen extracts. *Clin Allergy*, 6:429, 1976.
- 60.-Fradkin, V.A.: *Alergenos*. Ed. Mir, Moscú, 1980.
- 61.-Frankland, A.W., McEwen, L.M., Freimberg, J.G.: Skin reactions to dust and mites. *Int Arch Allergy Clin Immunol*, 37:351, 1970.
- 62.-Frazier, C.L.: Allergy and toxics reactions to insects and other arthropods. In: *Insect Allergy*, Warren E. Green Inc, St Louis, 1959.

- 63.-Fries, J.H.: Food Allergy. Current Concerns. Ann Allergy
46:260, 1981.
- 64.-Fudenberg, H.H., Stites, C.: Basic and clinical Immunology. Lang Medical publications, Los Altos, Calif., 1980.
- 65.-Galant, S. P., et al: An immunological approach to the -
diagnosis of food hypersensitivity. Clin Allergy, 9:
1979.
- 66.-Galant, S.P., Bullock, J., Wong, D.: The inhibitory ef--
fect of antiallergic drugs on allergen and histamine in--
duced wheal and flare response. J Allergy Clin Immunol,
51:11, 1973.
- 67.-Geller, M., Geller, M.: Serum IgE levels in giardiasis.
Clin Allergy, 8:69, 1978.
- 68.-Gibson, A., et al: Preparing Allergenic solutions. J Am
Pharm Assoc Practical Pharm, 6:244, 1943.
- 69.-Gleich, G.J., et al: Measurement of IgE in normal and -
allergic serum by Radioimmunoassay. J Lab Clin Med, 77:
690, 1971.
- 70.-Gleich, G.J., et al: The mini-RAST, comparison with -
other varieties of the RAST for the measurement of IgE -
antibodies. J Allergy Clin Immunol, 65:20, 1980.
- 71.-Gleich, G.J., et al: Measurement of the potency of allerg
y extracts by their inhibitory capacities in the RAST.
J Allergy Clin Immunol, 53:158, 1974.
- 72.-Gleich, G., J., Huel, U.R.: Measurement of histamine: a
quality control study. J Allergy Clin Immunol, 66:295, -
1980.

- 73.-Gordon, B.L.: Lo esencial de la inmunología. El Manual -
Moderno, S.A., México, 1978.
- 74.-Good, R. A., Fisher, D.W.: Inmunobiología. Editorial Es-
paxs, Barcelona, 1977.
- 75.-Gordillo, D.: Inmunidad, vacunación y seroterapia. Libre-
ría de Medicina, México, 1977.
- 76.-Gradwohl, H.: Clinical Laboratory Methods and diagnosis.
Vol I, pág. 502. The C.V. Mosby Co., St. Louis, 1970.
- 77.-Gross, G.N., et al: Isolation and partial characteriza-
tion of the allergen in mountain cedar pollen. Sand J -
Immunol, 8(5):437, 1978.
- 78.-Guerin, B., and Tioulong, S.: Annalysis of the non immu-
nological activity of allergen extracts in cutaneous tes-
ting. Clin Allergy, 9:283, 1979.
- 79.-Gwynn, C.M., et al: Bronchial provocation test in atopic
patients with allergen-specific IgG4 antibodies. The Lan-
cet, Vol I, enero de 1982, no. 8266, pág.: 254.
- 80.-Haddad, Z.H., Korntor, J. L.: Immediate hypersensitivity
reactions to food antigens. J Allergy Clin Immunol, 49:
210. 1972.
- 81.-Hardy, W.R., Anderson, R.E.: The hypereosinophilic sin-
dromes. Ann Inter Med, 68:1220, 1968.
- 82.-Hellreich, E.: Evaluation of Skin test with insect ex-
tracts in various allergic diseases. Ann Allergy, 20:803
1962.
- 83.-Hendrix, S.G., et al: The immune response in human and
rabbits to monomeric and polymeric grass allergens. J -
Clin Immunol, 2(1):10, 1982.

- 84.-Hendrix, S., Zeiss, R., et al: Polymerized whole ragweed a two year follow-up of patients treated with an improved method of immunotherapy. J Allergy Clin Immunol, 65: 57, 1980.
- 85.-Henry, J.S.: Clinical Diagnosis and Management. Saunders Co., London, 1980.
- 86.-Herbert, M.J., Wilkinson, P.C.: A dictionary of immunology. Blackwell Scientific publications, Oxford, 1971.
- 87.-Hoffman, D.R., Haddad, Z.H.: Diagnosis of IgE-mediated reactions to food antigens by Radioimmunoassay. J Allergy Clin Immunol, 54:165, 1974.
- 88.-Hofman, D. R., et al: Isolation of spore specific allergens from Alternaria. Ann Allergy, 46:310, 1981.
- 89.-Hunt, K.J., et al: Diagnosis of allergy to stinging insects by skin testing with himenoptera venoms. Ann Intern Med, 85:56, 1976.
- 90.-Hollistier-Stier Labs, Instructions for the collection of special dust samples. L.A., Calif. 1978.
- 91.-Ishizaka, K.: Cellular events in the IgE antibodies response. Adv Immunol, 23:1, 1976.
- 92.-Ishizaka, T., Ishizaka, K.: Triggering of histamine release from rat mast cells by divalent antibodies against IgE receptors. J Immunol, 120:800, 1978.
- 93.-Ishizaka, K. Ishizaka, T, Hornbrook, M.H.: Physicochemical properties of reaginic antibodies. J Immunol, 97:840,1966.
- 94.-Ishizaka, T., Ishizaka, K., Conrath, D., et al: A new concept of triggering IgE-mediated histamine release. J Allergy Clin Immunol, 61:320, 1978.

- 95.-Ishizaka, K., Okuda, H., King, T.P.: Immunogenic properties of modified antigen E: ability of urea-denatured antigen and a polypeptide chain to prime T-cells specific for antigen-E. *J Immunol*, 114 :110, 1975.
- 96.-Ishizaka, T., Ishizaka, K., Tomioka, H.: Mechanism of passive sensitization. I Presence of IgE and IgG molecules on human leucocytes. *J Immunol*, 105:1459, 1970.
- 97.-Ishikawa, T., Wicker, K., Arbesman, E.E.: In vitro and in vivo studies on uptake of antigen-antibody complexes by eosinophils. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 46:230, - 1974.
- 98.-Jarret, E., et al: Adjuvants in the induction and enhancement of rat IgE responses. *Clin Exp Immunol*, 39:183, - 1980.
- 99.-Johansson, S.G.O., Berg, T.L.D.: Allergy Diagnosis and The RAST. *J Allergy Clin Immunol*, 54:209, 1974.
- 100.-Johansson, S.G.O., Bennich, H.: Immunologic studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunol*, 13:381, 1967.
- 101.-Johansson, S.G.O., Björkstén, F.: Standardization of in vitro methods in atopic allergy. *Allergy*, 35:177, 1980.
- 102.-Johansson, S.G.O., Miller, A.M.L., et al: Glutaraldehyde-pollen-tyrosine: clinical and immunological studies. *Clin Allergy*, 4:255, 1974.
- 103.-Johansson, S.G.O., Deuschl, H.: Immunoglobulins in nasal secretion with special reference to IgE. I Retrospectival studies. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 52:354, 1976.

- 104.-Johnson, P., Marsh, D.G.: Allergens from common ryegrass pollen. *Immunochemistry*, 3:91, 1956.
- 105.-Katz, D.: Control of IgE antibodies by suppressor substances. *J Allergy Clin Immunol*, 62:44, 1978.
- 106.-Katz, D.: New concepts concerning the clinical control of IgE synthesis. *Clin Allergy*, 9(6):609, 1979.
- 107.-Kay, A., Stechschutte, D., Austen, F.: An eosinophil leukocyte chemotactic factor of anaphylaxis. *J Exp Med*, 133:602, 1971.
- 108.-Kay, A.: Studies on eosinophil leukocyte migration. II. Factors specifically chemotactic for eosinophils and neutrophils generated from guinea pig serum by antigen-antibody complexes. *Clin Exp Immunol*, 7:723, 1970.
- 109.-Kelly, J. F., et al: Polymerized whole ragweed: human safety and immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 55:50, 1980.
- 110.-Kim, G.R., et al: The eosinophilic changes in rhinorrhea due to nasal allergy. *Yonsei Med*, 18:157, 1977.
- 111.-King, T.P., Norman, P.S., Lichtenstein, L.M.: Isolation and characterization of allergen from ragweed pollen. *J Biol Chem*, 242:1992, 1967, *Biochemistry*.
- 112.-Kjellmann, M., Johansson, S.G.O.: Serum IgE levels in healthy children quantified by a sandwich technique (PRIST). *Clin Allergy*, 6:51, 1976.
- 113.-Kletter, B., et al: Immunoglobulin E antibodies to milk proteins. *Clin Allergy*, 1(3):3, 1971.
- 114.-Kolmer, J.A.: *Manual de Laboratorio Clínico*. Editorial Interamericana, 1940, México.

- 115.-Langris, G., P.G.: Allergen extracts and purified allergen in immunotherapy. *Ann Allergy*, 47:162, 1951.
- 115.-Langris, G., et al: The allergic response to stinging insects. VI. Fractionation of whole body and venom sac extracts of wasp. *J Allergy, Clin Immunol*, 37:359, 1966.
- 117.-Lee, M.Y., Schon, R.H.: Suppression of reaginic antibody formation. I. Induction of hapten-specific tolerance. *J Immunol*, 114:829, 1975.
- 118.-Lee, M.Y., Schon, R.H.: Suppression of reaginic antibodies with modified allergens, I. Reduction in allergenicity of protein allergens by conjugation to polyethyleneglycol. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 56:159, 1978.
- 119.-Lee, M.Y., Schon, R.H.: Suppression of reaginic antibodies with modified allergens. II. Abrogation of reaginic antibodies with allergens conjugated to PEG.
- 120.-Lessof, M.H., et al: Assessing the value of skin prick test. *Clin Allergy*, 10:115, 1980.
- 121.-Lichtenstein, L.: *Clinical Immunology*. F.H. Good Eds., Academic Press, N.Y., 1977.
- 122.-Lichtenstein, L.M.: Standardization and efficacy of allergen extracts. *N Eng J Med*, 295:1195, 1974.
- 123.-Lockey, S.O., et al: Manual of office and laboratory procedures. Prepared for the twelve annual graduated instructional course in Allergy. 1956.
- 124.-Lowenstein, H., et al: Extraction and degradation of timothy pollen allergen during simulated "in vivo" conditions. *Allergy*, 33(5):236, 1978.
- 125.-Lynde, L.L., et al: Sacht to sting with balsam of Peru and fragrance mix. *Contact Dermatitis*, 3(4):274, 1982.

- 126.-Maggin, E.T., et al: Immunology: current and future - - technology assesment. Clin Lab Med, 1(1):77, 1981.
- 127.-Magnusson, C.G.R., e. al: An automated particle counting immunoassay (PACIA) for serum IgE. Clin Allergy, - 11:453, 1981.
- 128.-Malley, A., Reed, C.E., Lietze, J.: Isolation of Allergens from timothy pollen. J Allergy, 33:84, 1962.
- 129.-Mansfield, L.E., Nelson, H.: Allergen in commercial house dust. Annals in Allergy. 48:205, 1982.
- 130.-Marsh, D.G.: Allergens and the genetics of allergy. En: The antigens, Sela, M., editor. Vol III. Academic Press N. Y., 1975.
- 131.-Marsh, D.G., et al: Genetic of human immune response to allergens. J Allergy Clin Immunol. 6:322, 1980.
- 132.-Marsh, D.G.: Preparation and properties of allergoids derived from native pollen allergens by mild formalin treatment. Int Arch Allergy Appl Immunol, 41:119, 1971.
- 133.-Marsh, D.G., et al: The allergenic activity and stability of purified allergens from the pollen of common rye grass (*Lolium perenne*). Int Arch Allergy Appl Immunol, 29:521, 1966.
- 134.-Mathew, E., Iarici, H., Fya, E.: Fisiopatología de los pólipos nasales. Alergia, 20:63, 1981.
- 135.-Mathew, E., Sindr, T., Marañón, J.: Allergy and Clinical Immunology. Excerpta Médica, Amsterdam, 1976.
- 136.-Matsunoto, T., et al: IgG by-sitosis and IgE-bearing cells in atopic and normal peripheral blood. Ann Allergy, 47:47, 1981.

- 137.-May, C.E., et al: A modern clinical approach to food hi
persensitivity. Allergy, 33:166, 1978.
- 138.-May, J.C., et al: Optimization of parameters in protein
nitrogen units precipitation procedures for allergenic
extracts. J Allergy Clin Immunol, 63:67, 1979.
- 139.-Mc Deritt, H.P., Sadmer, W.: HLA immune response genes
and diseases. Lancet, 1:1269, 1974.
- 140.-Middleton, E., Reen, D.E., Ellis, E.E.: Allergy princi-
ples and practice. CV Mosby Co., St Louis, 1978.
- 141.-Montes, J., Ciesneros, V.: Los pólenes atmosféricos de
la ciudad de México, D.F. Alergia, Abril de 1982, Vol.-
XXIX, No. 2, p. 51.
- 142.-Morrison, D.C., Henson, P.R. Immediate hypersensitivity
modern concepts and developments. Ed. M.K. Sach, M. De-
kker, Inc. N.Y., 1978.
- 143.-Morrow, E.B., et al: A summary of air borne mold survey.
Ann Allergy, 22:575, 1964.
- 144.-Muehler-Eberhard, H. J.: Chemistry and reactions mecha-
nism of complement. Adv Immunol, 6:1, 1955.
- 145.-Myers, E., et al: Measurement of urinary histamine. De-
velopment of methodology and normal values. J Allergy -
Clin Immunol, 67:305, 1981.
- 146.-Nagakawa, B., et al: Flow cytometric analysis of human
basophil degranulation. Clin Allergy. 11:21, 1981.
- 147.-Nagaya, T.: Long term effects of conventional immunothe-
rapy in southern California. Ann Allergy, 44:193, 1980.

- 148.-Nathan, R.H., et al: A comparison of the actions of H₁ and H₂ antihistamines on histamine-induced bronchoconstriction and cutaneous wheal response in asthmatic patients. J Allergy Clin Immunol, 67:171, 1981.
- 149.-Nielssen, H.S.: Effects of preservatives and conditions of storage on the potency of allergy extracts. J Allergy Clin Immunol, 67:64, 1981.
- 150.-Norman, P.S., Lichtenstein, L.M.: Capacity of purified-antigen and whole pollen extracts to release histamine from leucocytes of hay fever patients. J Allergy Clin Immunol, 52:94, 1973.
- 151.-Norman, P.S.: An overview of immunotherapy: Implications for the future. Allergy Clin Immunol, 65:87, 1980.
- 152.-O'Connor, R., Erickson, R.; Hymenoptera antigens: an Immunological comparison of venom, venom sac extracts, and whole insects extracts. Ann Allergy, 23:151, 1965.
- 153.-Olenknoch, S.A., et al: Complement activation by commercial allergen extracts of cereal grains. Clin Allergy, 10:395, 1980.
- 154.-Osler, A.G.: Functions of the complement system. Adv Immunology, Vol 1:131, 1961.
- 155.-Palmer, D.J.: Bee World. Progress in Allergy, 42:225, 1981.
- 156.-Patterson, R., et al: Polymerized tree pollen antigens. J Allergy Clin Immunol. 57:132, 1981.
- 157.-Patterson, R.: Allergic diseases. Diagnosis and management. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1980.

- 158.-Fayne, T.G., et al: Radical scavenging and stimulation -
of prostaglandins synthesis non anti-inflammatory? Nature,
296:160, 1982.
- 159.-Pearlman, F.: Insects as in'alent allergens. J Allergy
29:302, 1958.
- 160.-Pelczar, J., Reid, R.: Microbiología. Mc Graw Hill, Mé-
xico, 1978.
- 161.-Pelikan, A., et al: A diagnostic study of immediate hy-
persensitivity in asthmatic patients: a comparison of
bronchial challenge and serum RAST. Ann Allergy, 49(2):
112, 1982.
- 162.-Pepys, J., Chan, M., Hargrave, F.E.: Hites and House -
dust allergy. Lancet, 1:1270, 1968.
- 163.-Pepys, J., et al: RAST, skin and nasal test and the --
history in grass pollenallergy. Clin Allergy, 5:431, -
1976.
- 164.-Phillips, G.S.: Preparation of allergenic extracts for
testing and treatment. En: A manual of Clinical Allergy
Editado por Sheldon, J., Level, R., Mathews, K. U.S. .-
Saunders Co., Philadelphia, 1978, pág. 507.
- 165.-Prince, H.E., et al: Molds and bacteria en the etiology
of respiratory allergic diseases. XXI. Studies with mold
extracts produced from cultures grown in modified synte-
tic media. Ann Allergy, 19:259, 1961.
- 166.-Puttanen, E., Paasch, J.: Measurement of alum precipita-
ted allergen extracts by RAST inhibition methods. Clin
Allergy, 11:139, 1981.

- 167.-Radermecker, M., et al: Increased complement mediated - leukocytic histamine release in atopics. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 68(4):365, 1982.
- 168.-Ramírez Oviedo, A., Rodríguez, B.: Estudio ilustrado de los pólenes del aire de México más comunes. *Alergia*, 8: 187, 1961.
- 169.-Rankin, J.A., et al: IgE-dependent release of Leukotriene C4 from alveolar macrophages. *Nature*, 297:329, 1982.
- 170.-Raniäntyjärvy, P., Jouselathi, P., Katila, M.L.: Antibodies to *Aspergillus fumigatus* in farmer's lung patients measured by ELISA. *Clin Allergy*, 10:187, 1980.
- 171.-Reed, C.: Variability of antigenicity of *Aspergillus fumigatus*. *J Allergy Clin Immunol*, 61:227, 1978.
- 172.-Reid, R.T.: Reaginic activity associated with immunoglobulins other than IgE. *J Immunol*, 104:35, 1970.
- 173.-Reid, M.J., et al: Microtiter solid phase RIA for specific IgE. *J Allergy Clin Immunol*, 67:236, 1981.
- 174.-Reissman, R.E.: Insect Allergy. Chap. 39, página 1100, Vol II de: *Allergy: principles and practice*, Editado por Middleton, E., Reed, E., Ellis, E. CV Mosby Co., St. - Louis, 1978.
- 175.-Reissman, R.E.: Clinical and immunologic studies of venom immunotherapy. *Clin Allergy*, 9(2):167, 1979.
- 176.-Ribon, A., et al: Standardization of allergen extracts. *Ann Allergy*, 41(5):293, 1978.
- 177.-Rosemberg, E., et al: Increased circulating IgE in parasitic diseases. *N Eng J Med*, 283:1148, 1970.

- 177.-Leshem, A., Lessoff, M.H.: Hypersensitivity to drugs.-
Clin Allergy, 1:2, 1971.
- 179.-Salazar Mallén, M., Cueva, J.: Sustancia de Friel. Pre
sa Médica Mexicana. Nos. 10 y 11, 1947.
- 180.-Salazar Mallén, M.: La alergia en la práctica y la clí-
nica, Librería de Medicina, México, 1972.
- 181.-Salazar Mallén, M.: Estudio de los pólenes de la atmós-
fera de la ciudad de México. Rev Soc Mex Hist Nat, No.
3:147, 1940.
- 182.-Salmon, S.E., McKey, G., Fudenberg, H.H.: "Sandwich" -
technique solid phase radioimmunoassay for the quantita-
tive determination of human immunoglobulins. J Immunol,
103; 129, 1969.
- 183.-Santilli, J., et al: Skin reactivity to purified pollen
allergens in highly ragweed-sensitivity individuals. J
Allergy Clin Immunol, 65:406, 1980.
- 184.-Sepúlveda, R., Longbottom, J. Pegys, J.: Enzyme Linked
immunosorbent assay for IgG and IgE antibodies to pro- -
tein and polysaccharide antigens of Aspergillus fumiga-
tus. Clin Allergy, 9:359, 1979.
- 185.-Shafiee, A., et al: Isolation and characterization of -
russian thistle (Salsola Pestifer) pollen allergens. J
Allergy Clin Immunol, 67:474, 1981.
- 186.-Sheard, P., et al: Antigen-induced release of histamine
and S'S-A from human lung passively sensitized with rea-
ginic serum. Nature, 215:233, 1967.
- 187.-Shon, A.H., Lee, W.V.: Suppression of IgE antibodies -

- with modified allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 64:242
1979.
- 188.-Sehon, A.H., Lee, W.Y.: Tolerance induction in immediate hypersensitivity. *Clin Allergy*, 9:625, 1979.
- 189.-Sela, M. (Editor): The antigens. Academic Press, N. Y.
1974.
- 190.-Settipan, G.A., Carlisle, C.C.: A critical evaluation of RAST to venom hymenoptera. *Clin Allergy*, 10:667, -
1980.
- 191.-Settipan, C.: Natural history of allergy to hymenoptera. *Clin Allergy*, 9:385, 1979.
- 192.-Sheldon, J.A., Lovell, R.G., Mathews, K.P.: Preparation of allergenic extract for testing and treatment. A manual of Clinical Allergy. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1977.
- 193.-Shulman, S.: Insect Allergy: Biochemical and immunological analysis of allergens. *Prog Allergy*, 12: , 1968.
- 194.-Shulman, S., et al: The allergic response to stinging insects. V Fractionation of whole body and venom sac extracts of bee. *Allergy*, 37:350, 1966.
- 195.-Shulman, S., Langlais, E., Arboiman, C.E.: The allergic response to stinging insects. I Preparation of extract and their biochemical characterization. *J Allergy*, 35: 446, 1964.
- 196.-Small, P., Frankel, S., Block, H.: Multifactorial etiology of nasal polyps. *Ann Allergy*, 46:317, 1981.
- 197.-Smedegard, R., et al: Leukotriene B₄ affects pulmonary and cardio-vascular dynamics in monkey. *Nature*. 295:227, 1982.

- 198.-Snyderman, R., Meadows, L.: Chemotaxis and the complement system. Methodology to quantify a biological activity of Complement in humans. En: Clinical aspects of the complement system. International symposium. Edited by: U. Opterkuch, K. Rotheraid, D. Schultz, G. Thieme Publishers, Stuttgart, 1978.
- 199.-Solomon, W.R.: Aeroallergens. Techniques of air sampling. En: Sheldon, Lovell, Mathew, A manual of clinical allergy. 2a. Ed. W.B. Saunders, Co., Philadelphia, 1967.
- 200.-Solomon, W.E.: Assessing fungus prevalence in domestic interiors. J Allergy, 56:235, 1975.
- 201.-Stanworth, D.R.: Immunochemical mechanisms of immediate type hypersensitivity reactions. Clin Exp Immunol, 6:1 1970.
- 202.-Stanworth, D.R.: Reaginic antibodies. Adv Immunol, 3:181 1963.
- 203.-Stanworth, D.R.: Immediate hypersensitivity. American Elsevier Pub., N.Y., 1970.
- 204.-Stempel, D.A.: Seasonal variations of serum IgE levels in normal children. Ann Allergy, 47:14, 1981.
- 205.-Strejan, E.M., Surlan, D.: Reaginic antibodies production in the ascaris suum allergen, ASC-1. I. The function of glutaraldehyde-polymerized antigen in the induction of reaginic antibodies in rats. Int Arch Allergy - Appl Immunol, 54:467, 1971.
- 206.-Strejan, E.M., Surlan, D.: II.-Influence of type of ad-

- juvant in carrier priming on the induction of IgE and IgG antibodies to DNP conjugates. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 54:501, 1977.
- 207.-Stewart, D.E.S., et al: Immunosuppressive effect in mycobacterial adjuvant emulsions of mineral oils containing low molecular weight hydrocarbons. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 52:18, 1976.
- 208.-Strauss, M.B., Spain, W.C.: Preparation of active allergic extracts. *J Allergy*, 12:61, 1940.
- 209.-Stull, A., et al: Chemical and clinical studies on pollen. *J Allergy*, 1:470, 1930.
- 210.-Sobotka, A., et al: Allergy to insect sting. I Diagnosis of IgE-mediated hymenoptera venom sensitivity by release histamine induced by venom. *J Allergy Clin Immunol*, 53:170, 1974.
- 211.-Summers, R., et al: Effects of infused histamine on asthmatic and normal subjects: comparison of skin test responses. *J Allergy Clin Immunol*, 67:456, 1981.
- 212.-Tovey, V.: Hite allergen content in commercial extracts and in bed dust determined by RAST. *Clin Allergy*, 9(3): 253, 1979.
- 213.-Tuft, L.: Allergy management in clinical practice, Mosby Co. St Louis, 1973.
- 214.-Tuft, L., Cloninger, C.I.: Studies in Food Allergy. *J Allergy*, 13:574, 1942.
- 215.-Turner, H.S., et al: Standardization of allergen extract by inhibition of the RAST, skin test, and chemical con-

- position. Clin Allergy, 10:447, 1980.
- 216.-Unger, L.: Bronchial Asthma. Thomas Eds., 1946.
- 217.-Unger, L.; Moore, M.: Studies on pollen and pollen extracts. IX. A new extracting solution. J Allergy, 4:92, 1932.
- 218.-Voorhast, R., Spijkma, F.W.: The house dust mite (*dermatophagoides pteronissinus*) and the allergen it produces. Identify with the house dust allergen. J Allergy, 39:395 1967.
- 219.-Waldman, T.A., Strober, W.: Metabolism of immunoglobulins. Prog Allergy, 13:1, 1969.
- 220.-Warren, M.P.: Mold hypersensitization in rhinitis: a two year study. Ann Allergy, 30:122, 1972.
- 221.-Weeke, B., et al: Food Allergy. Allergy, 33(4):163, -- 1978.
- 222.-Welsh, P.W., et al: Preseasonal intranasal immunotherapy with nebulized short ragweed extract. J Allergy Clin Immunol, 67:237, 1981.
- 223.-Wide, L, Bennich, H., Johansson, S.G.O.: Diagnosis of allergy by an "in vitro" test for allergen antibodies. - Lancet, 11:1105, 1957.
- 224.-Willoughby, J. W.: Diagnosis of Allergy by serial dilution skin end point titration. Continuing education for the family physician, 11:3, 1976.
- 225.-Wilson, F.P., Sekul, A., Cry, P.: Activation of the alternative pathway by extracts of cotton dust. Clin Allergy, 10:303, 1980.

- 226.-Lantrhaid, A.: RAST in the diagnosis of hypersensitivity to dog and cat allergens. Clin Allergy. 9(2):191, - 1979.
- 227.-Wraith, D.G., et al: Recognition of food allergic patients and their allergens by the RAST technique and clinical investigation. Clin Allergy. 9:25, 1979.
- 228.-Wodehouse, R.F.: Hay fever plants. Chronica Botanica Co. Waltham, Mass., USA, 1945.
- 229.-Wodehouse, R.F.: Pollen grains. Mc Graw Hill Co., N.Y., 1935.
- 230.-Wong, L. Mendeler, L., Weingerger, M: Pharmacologic prophylaxis of allergic rhinitis: relative efficacy of hydroxyzine and chlorpheniramine. J Allergy Clin Immunol, 67:233, 1981.
- 231.-Zapater, R.C.: Micología Alergógica. El Ateneo, Buenos Aires, 1955.
- 232.-Zeiss, Comparison of the RAST with an quantitative solid phase radioimmunoassay for the detection of ragweed specific IgE antibodies in patients undergoing immunotherapy (STRIA). J Allergy Clin Immunol, 67:105, 1981.
- 233.-Zolov, D.F., Levine, S.S.: Correlation of blood eosinophilia with antibodies classes. Studies with the penicillin hypersensitivity system. Int Arch Allergy Appl Immunol, 35:179, 1969.
- 234.-Zondek, S., Bromberg, P.: Endocrine allergy. J Allergy, 16:1, 1945.
- 235.-Zweiman, J., et al: Factors in the tissue eosinophil responses. Int Arch Allergy Appl Immunol, 52:46, 1976.