



47
21

Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
" Z A R A G O Z A "

ESTANDARIZACION DE ALERGENOS POR LA TECNICA
DE INHIBICION DEL RAST, UNIDADES HEP Y
DETERMINACION DE PNU

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N
ADAN VALLADARES SALGADO
RAUL SILVA GARCIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Marzo de 1991





Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

C O N T E N I D O

PAG.

Introducción	
Fundamentación del tema	
Planteamiento del problema	
1. Generalidades.....	4
2. Hipersensibilidad tipo I.....	8
3. Alergenos.....	18
4. Enfermedades alérgicas.....	24
5. Estandarización de extractos alérgicos.....	28
6. Objetivo.....	36
7. Hipótesis.....	37
8. Metodología.....	38
9. Resultados.....	50
10. Discusión de resultados.....	78
11. Conclusiones.....	81
12. Anexo.....	82
13. Bibliografía.....	84

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

La administración de extractos alergénicos en la terapia de las enfermedades alérgicas, fué utilizada por Noon en 1911. Desde entonces el tratamiento a pesar de haber mostrado su eficacia ha dado origen a las más variadas controversias, debido a los escasos conocimientos que se tenían sobre la naturaleza y características de sus antígenos, así como los mecanismos sobre los cuales actúan y su capacidad para inducir otras patologías.

La estandarización y caracterización de los extractos alergénicos se presenta como un tema de primordial resolución. A principios de siglo, Noon introduce el primer sistema de estandarización relacionado peso/volumen. Posteriormente supone un logro el advenimiento de las Unidades de Nitrógeno Proteico (PNU). Sin embargo, no reflejaba actividad alérgica, sino su naturaleza química (15, 17, 42, 47, 53)

Debido a los avances recientes en el campo inmunológico, se han obtenido grandes logros sobre la estandarización de extractos alergénicos y se trata de saber la verdadera actividad alérgica de los mismos. De ello han surgido las unidades biológicas (UB/ml Europa) y unidades alérgicas (UA/ml E.U.A.), con las cuales se han obtenido un mayor significado clínico. Para comprobar esta actividad se han utilizado métodos in vivo (pruebas cutáneas: intradermorreacción, punción, escarificación, punción equivalente de histamina) e in vitro (degranulación de basófilos, IgE específica) (17, 20, 40, 56, 57, 58, 62).

La aplicación de extractos alergénicos estandarizados en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades alérgicas (rinitis, asma, dermatitis atópica) ha dado mejor resultado e. la respuesta clínica cuantitativa, que los extractos no estandarizados (17).

FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

En 1906 Von Pirquet introduce el término Alergia para designar la capacidad de reacción diferente a la habitual bajo un estímulo a una sustancia extraña sensibilizante que se denominó alérgeno.

Cuando una respuesta inmunitaria adaptativa se produce en forma exagerada o inapropiada, causando lesiones hísticas, se aplica el -- término hipersensible. La hipersensibilidad es una característica - del individuo que se manifiesta después del segundo contacto con un antígeno (Ag) determinado. Coombs y Cell describieron 4 tipos de hi persensibilidad: Tipo I, II, III y IV (48, 52).

Los tres primeros están mediados por anticuerpos (Ac) y el cuar to sobre todo, por células T y macrófagos.

Tipo I. Es el de mayor interés debido a que es el tipo de reac ción que se presenta primero en el diagnóstico de alergias respirato rias (por pruebas cutáneas y pruebas de escarificación).

En esta reacción las células cebadas se unen a la IgE mediante - sus receptores a la fracción cristalizable. Al contacto con el Ag la IgE se entrecruza induciendo desgranulación y liberación de mediado- res como la Histamina la Sustancia de Reacción Lenta de Anafilaxia y el Factor Quimiotáctico de eosinófilos y polimorfonucleares (48, 52).

Por la gran importancia que tienen los extractos alérgicos uti lizados en el Servicio de Alergia para el diagnóstico de alergias res piratorias, debe procurarse un control de calidad extricto en su pro- ducción, tanto en el método de preparación como en el del control de su potencial alérgico, por el peligro que entraña en pacientes alta mente sensibles a presentar una respuesta inmunológica tipo I.

En el Servicio de Alergia del Hospital General de México SS. - sólo en el mes de enero de este año se registraron 102 pacientes con síntomas de alergia respiratoria; el 40% se presentó con diagnóstico de rinitis simple, el 25% con rinitis mixta, el 10% con asma bronquial, el 20% con urticaria, 4% con conjuntivitis y el 1% con dermatografismo.

En el Laboratorio se realizó un total de 602 preparados de extractos alérgicos en el mismo mes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se preparan los extractos alérgicos utilizados en el diagnóstico de enfermedades alérgicas y se les determinará el nitrógeno proteico por la técnica de Micro-Kjeldhal.

Se realizarán las pruebas cutáneas por duplicado con diferentes diluciones del extracto alérgico a estandarizar en 30 pacientes que presentan sensibilidad de 3 o más cruces a dicho alérgeno. También se practicará la prueba cutánea con histamina como testigo positivo con dilución de 1/1000 para la obtención de unidades HEP.

Se realizará la prueba de inhibición del RAST para determinar la cantidad del extracto alérgico que inhiba el 50% de los enlaces entre el antígeno en fase sólida y el anticuerpo IgE. Todo esto en conjunto para lograr la estandarización de la inmunogenicidad de los alérgenos.

1. GENERALIDADES

1.1. HISTORIA DE LA ALERGIA

La inmunidad comprende un conjunto de mecanismos que contribuyen a desarrollar y preservar la integridad de los seres vivos.

Desde hace mucho tiempo atrás se sabía que ciertos alimentos totalmente inocuos para la mayoría de los individuos, producían síntomas patológicos en otros, a esto se llamó idiosincracia (22, 28, 29, 48, 52).

En 1961 Jacob de Rebeque, quien sufría de "catarro de heno" notaba que las rosas emitían algo que irritaba su nariz y provocaba una secreción hialina.

En 1819 Bostock y Wyman hizo una descripción clínica exacta de la "fiebre de heno" aplicando polen de toda clase de hierbas y plantas sobre la mucosa conjuntival demostrándose así su eficacia para producir ataques de catarro (40).

A finales del siglo XIX, se conocía la respuesta clínica y la etiología pero no los mecanismos inmunológicos.

En 1810 Von Behring descubrió el uso profiláctico del antisuero - contra la toxina diftérica. En 1902 buscando otros sueros profilácticos, Portier y Richet notaron una reacción inmediata semejante al choque, en un perro sensible a la toxina de una anémona marina, denominaron a esta reacción nociva antilaxia o anafilaxia para distinguirla de la profilaxia (28, 29, 48, 52).

En 1903 Arthus describió un fenómeno que se producía cuando se administraba cada 6 días un antígeno por vía subcutánea a un animal, en general a la sexta administración se producía inflamación que llegaba

a la necrosis, demostrando así la ausencia de sustancias tóxicas causantes de la lesión (52).

En 1906 Von Pirquet introduce el término alergia (del griego -- "ALLOS": otro y "ERGOS": respuesta), que servía para designar la capacidad de un tejido de reaccionar en forma diferente a la habitual bajo un estímulo subsecuente a una sustancia extraña sensibilizante -- (48, 49, 52).

En 1911 Cooke introduce las pruebas cutáneas con alérgenos proteicos para el diagnóstico de las enfermedades alérgicas. En este mismo año Freeman y Noon contribuyen al conocimiento de la hiposensibilización específica y de las polinosis (49).

En 1921 Prauznitz y Küstner descubrieron que algún elemento del suero, probablemente un anticuerpo, podía transferir la inmunidad o la alergia de un individuo a otro. Esta transferencia pasiva se lleva a cabo aplicando suero de un alérgico en la piel de una persona normal. Veinticuatro horas después, la administración del alérgeno en el mismo sitio donde se había inyectado el suero del donador, producía inmediatamente eritema y edema (40, 54).

En 1923 Coca y Cooke introducen el término "atopia" (atopos: no común), para describir las características clínicas de hipersensibilidad tipo I que incluyen: asma, eccema (dermatitis atópica), fiebre del heno (rinitis alérgica) y urticaria, en personas con historia familiar de trastornos similares y que muestran positividad a las reacciones cutáneas inmediatas (48).

Dale en 1929 propone que en el shock anafiláctico, la reacción - antígeno-anticuerpo originaba la liberación de histamina de los tejidos en donde tenía lugar tal evento (40).

En 1932 Feldberg, Bartosch y Nagel, aislaron la histamina de una perfusión pulmonar proveniente de un animal sensibilizado (52).

Hasta la década de los 50's, se contempla la descripción clínica y alergológica, sin embargo con los estudios de Sanger en 1956 se inicia la era de la inmunología y les corresponde a T. Ishizaka y K. -- Ishizaka en 1967 (E.U.A.) y Johanson y Benich en 1968 (Suecia), aislar e identificar el anticuerpo responsable de la anafilaxia, la IgE (52, 48, 54).

1.2. REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD

Actualmente la alergia y la atopia representan un número importante de enfermedades con morbilidad significativa aunque sabemos que la función del sistema inmunitario es proteger al huésped de los antígenos extraños, las respuestas inmunes anormales pueden producir lesión de los tejidos. Gell y Coombs (1969) han clasificado los mecanismos de las lesiones inmunológicas en cuatro tipos distintos de reacción, lo que permite comprender mejor la inmunopatogénesis de estas enfermedades (22, 48, 52).

Tipo I: Hipersensibilidad inmediata o reacción anafiláctica, mediada por IgE (sistema homólogo) e IgG4 (sistema heterólogo).

Tipo II: Reacción citotóxica mediada por IgM e IgG. El anticuerpo está dirigido contra los antígenos de las proteínas celulares del individuo. Esto puede producir una reacción citotóxica

por las células K o la lisis mediada por el complemento.

Tipo III: Reacción mediada por complejos inmunes (IgM, IgG). Estos se depositan en tejido. Se activa el complemento y los polimorfonucleares atraídos hacia el lugar del depósito causando lesión.

Tipo IV: Hipersensibilidad tardía (mediada por linfocitos T, inmunidad celular). Las células T sensibilizadas por el antígeno liberan linfocinas después de un contacto secundario con él mismo. Las linfocinas inducen reacciones inflamatorias, activan y atraen a los macrófagos que liberan mediadores (48, 52).

Esta se puede presentar en cuatro formas:

- a) Reacción de Jones Mote.
- b) Dermatitis de contacto.
- c) Reacción tipo tuberculina.
- d) Granuloma tipo Mitsuda y Kveim.

2. HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA (TIPO I)

2.1. DEFINICION

La hipersensibilidad inmediata o reacciones tipo I son las que tienen importancia en esta investigación puesto que median los procesos alérgicos (48).

La IgE se une a las células cebadas mediante sus receptores para Fc al contacto con el antígeno (alergenos: polínicos, fúngicos, ácaros, tegumentarios, fármacos y otros), la IgE se entrecruza induciendo la degranulación y la liberación de mediadores como la histamina, leucotrienos (LTC₄, LTD₄, LTE₄; anteriormente llamados SRL-A), serotonina, bradicina, heparina, tromboxanos, prostaglandinas y el factor quimiotáctico de los eosinófilos (FQ-E). Este es el mecanismo responsable de los síntomas alérgicos y su manifestación depende del órgano de -choque.

2.2. INMUNOGLOBULINA E

2.2.1. Características generales.

Las inmunoglobulinas son moléculas proteicas que portan actividad de anticuerpo, comprenden un grupo heterogéneo de proteínas que constituyen aproximadamente el 20% de las proteínas plasmáticas totales, en la electroforesis, la mayoría migra a la zona gamma y algunas a la zona beta-globulina.

Estas son glicoproteínas compuestas de 82-96% de polipéptidos y de 4-18% de carbohidratos, el componente polipeptídico posee casi todas las propiedades biológicas. La IgE tiene un peso molecular de aprox. 190,000 d (8S) comprende solo el 0.004% del total de las inmunoglobulinas séricas, se liga con gran afinidad a las células cebadas a través de su receptor para la fracción Fc.

La reexposición a un antígeno provoca generalmente la aparición de anticuerpos de la clase IgG, sin embargo la reexposición a alérgenos, provoca en individuos predispuestos reacciones de tipo I. Este anticuerpo no activa el complemento, ni atraviesa barrera placentaria, su concentración varía con la edad y es del orden de 0.0003 mg/ml. A pesar de la concentración tan baja de la IgE en circulación se conoce su estructura primaria debido a estudios sobre mielomas hiper-IgE.

El peso molecular más alto de la cadena pesada es de 72,500 - daltones y está compuesta aproximadamente de 550 aminoácidos distribuidos en 4 dominios de la región constante y una en la región variable. Las células plasmáticas productoras de IgE se encuentran en amígdalas, adenoides, submucosa de vías respiratorias y tracto digestivo.

Su vida media es de 2-3 días en circulación, sin embargo unida a células es mucho más larga, se calcula que una tercera parte de la IgE total se renueva diariamente. Su catabolismo diario es del 89%, esto sugiere que se esta formando en grandes cantidades (44).

En padecimientos atópicos es posible que la IgE se metabolice lentamente o que su producción sea mayor a nivel del órgano afectado, lo cual explica el alto nivel en suero y otros líquidos orgánicos de pacientes atópicos.

2.2.2. Genética, atopia y alergia.

En la respuesta alérgica contribuyen factores genéticos y factores ambientales. Se ha demostrado que cuando ambos padres son alérgicos, el 50% de los hijos padecen alergia. Incluso con un padre alérgico el porcentaje es casi del 30%. Cuando ninguno de los padres es alérgico, aproximadamente un 16% desarrolla un tipo de alergia.

Los principales mecanismos genéticos que regulan la respuesta alérgica son:

a) Nivel total de IgE. Cuanto mayor es el valor de IgE sérica total, más elevada es la probabilidad de atopia. En familias en lo que por lo menos un miembro tiene valores altos de IgE confirma la --

hipótesis de que los niveles bajos de ella se asocia con un gen do minante.

b) Respuesta inmunitaria ligada al HLA.

c) Capacidad de respuesta general aumentada.

Factores ambientales. Se ha calculado que se tiene contacto - anualmente con un μg de polen, sin embargo los síntomas aparecen so lo cuando se supera el umbral alérgico, que depende de la intensidad de la exposición al alérgeno y la capacidad del individuo de generar respuesta tipo IgE a una concentración baja de alérgeno, presencia - de infecciones víricas en tracto respiratorio alto, la disminución - de la actividad supresora o la deficiencia transitoria de la IgA.

Las infecciones víricas exacerbaban los síntomas alérgicos, proba blemente se deba a que algunos virus como el Herpes simplex, aumenta la liberación de histamina por los basófilos. Además, pueden facili tar la entrada del alérgeno a través de las superficies epiteliales dañadas e incrementar la respuesta de los órganos de choque a la hig tamina (22, 43, 48).

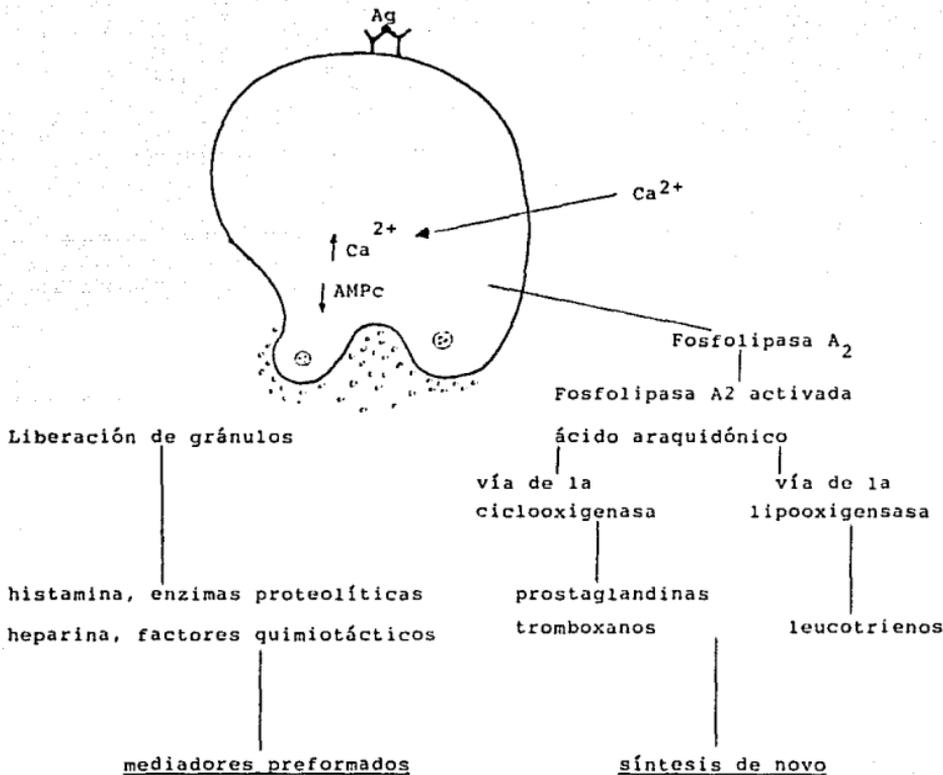
2.2.3. Mecanismo inmunológico.

Las células cebadas se encuentran en tejido conjuntivo y mucosas, mostrando una distribución distinta, la concentración más alta se encuentra en la mucosa del intestino medio y del pulmón.

Las células cebadas y basófilos presentan receptores para Fc de la IgE (Fc^E) de alta afinidad (Kd:10¹⁰).

En la exposición al polen, hay ruptura de su membrana externa e interna exponiendo sus antígenos solubles que se difunden a través de la mucosa nasal son transportados a los ganglios linfáticos locales donde se produce una respuesta IgE. Las células cebadas migran a los ganglios linfáticos locales y adquieren IgE específica para el alérgeno y migran nuevamente al órgano de choque. Estas células cebadas se degranulan después de un segundo contacto con el antígeno, liberando mediadores (48).

Liberación de mediadores. La reacción alérgeno-IgE aumenta la permeabilidad de la membrana de la célula cebada, conduciendo a la entrada de iones calcio, ocurriendo excitación de los gránulos, con liberación de mediadores preformados e inducción de la síntesis de mediadores formados "de novo" a partir del ácido araquidónico que conduce a la producción de prostaglandinas tromboxanos y leucotrienos (48).



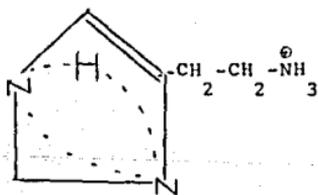
2.2.4. Mediadores químicos.

MEDIADOR	EFFECTO
Histamina	vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar - quimioquinesis, broncoconstricción.
Heparina	anticoagulante
Enzimas	
triptasa	proteolítica
B-glucosaminidasa	C3-convertasa, escinde los residuos glucosamina.
Factores activadores y quimiotácticos	quimiotáxis de eosinófilos activación de neutrófilos- y plaquetas.
Leucotrienos	vasoactivos broncoconstricción quimiotácticos y/o quimioquínéticos.
Prostaglandinas y Tromboxanos	contracción del músculo bronquial, agregación de plaquetas, vasodilatación.

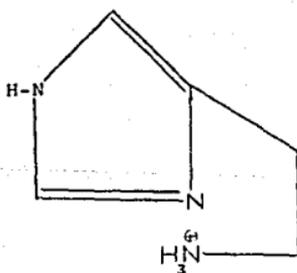
2.2.5. Receptores histamínicos: H₁ y H₂

Existen subclases definidas de receptores para histamina. El H₁ (Ashy Schilo 1966) y el H₂ (Black y Cols. 1972). El primer tipo se encuentra en piel; mucosa nasal, intestinal y bronquial y es bloqueada selectivamente por antihistamínicos como epinefrina, terfenadrina y astemizol. El H₂ se localiza en mucosa gástrica, es -- bloqueada por cimetidina y ranitidina entre otros.

La histamina es el 2-(4-imidazol)-etilamina. Es una molécula hidrofílica compuesta por un anillo imidazólico y un grupo amino - unidos por dos grupos metileno. La forma farmacológicamente activa es el tautómero monocatiónico N-H. Se ha propuesto que la forma I y II actúan en diferentes receptores (8, 26, 39).



I



II

Efectos como la broncoconstricción y la contracción del intestino están mediados por el receptor H_1 . Otros en especial la secreción gástrica, son totalmente refractarios a éste e involucra la - activación de los receptores H_2 . Sin embargo la hipotensión debida a la dilatación vascular está mediada por ambos.

Actualmente se postula la existencia de receptores H_3 en pulmón.

2.2.6. Significado clínico de la IgE.

Diversos estudios han demostrado la correlación entre sueros de individuos con IgE elevada y enfermedades atópicas. La mayor parte de los adultos y niños sanos tienen valores de IgE por debajo de 20 KU/L, mientras que los pacientes alérgicos presentan generalmente valores muy elevados.

En niños los valores de IgE varían de acuerdo con la edad en cordón umbilical los niveles son relativamente bajos (menos de 0.5 KU/L), la media de IgE en suero a la edad de un año asciende de 2 a 10 KU/L. Normalmente la concentración más alta es antes de la pubertad. En otro estudio se encontró que la concentración de IgE en niños atópicos es de 45 veces mayor que los no atópicos.

La diferencia entre alérgicos y normales es marcada en poblaciones donde las infecciones parasitarias no son endémicas, porque de lo contrario el uso de esta prueba se vería limitada para el diagnóstico de enfermedades alérgicas.

Se ha demostrado que concentraciones elevadas en sangre de -
cordón umbilical y niveles altos en niños sanos es el mejor pará-
metro para predecir el desarrollo de padecimientos alérgicos.

En resumen, la determinación de IgE es de mucho valor en el -
diagnóstico de pacientes con varios síntomas clínicos de enfermedad
des atópicas (7, 43).

3. ALERGENOS

3.1. DEFINICION

Son antígenos solubles que producen una respuesta alérgica - mediada por anticuerpos IgE. La mayoría tiene peso molecular de -- 10,000 a 70,000 d.

Los antígenos menores de 10,000 d son incapaces de unir los sitios Fab entre dos moléculas de IgE, excepto cuando están polimerizados. Los alérgenos con peso molecular mayor a 70,000 d no penetran fácilmente la mucosa, pero pueden sensibilizar en concentraciones bajas - (52).

La mayoría son proteínas o glicoproteínas solubles de tipo secuencial o conformacional.

3.2. CLASIFICACION

De acuerdo a su frecuencia y vía de exposición se clasifican en:

1. INHALABLES (aeroalérgenos). Son todos aquellos que transportados por el aire (anemófilos), se ponen en contacto - con la mucosa nasal y/o bronquial y conjuntival.

origen

- a) vegetal: pólenes, tamos, pochote, algodón.
- b) microbianos: hongos, ácaros, bacterias.
- c) animal: pelos, caspas, plumas, epitelios.
- d) diversos: polvo casero, fibras.

2. INGERIBLES

3. INYECTABLES

4. CONTACTANTES

A continuación se describen los incisos a y b por ser los alérgenos de interés en nuestro país.

a) VEGETAL.

1. Pólenes: Son células germinales producidas en el andróceo de las flores de malezas, árboles, arbustos y pastos.

Los pólenes alérgicos miden de 20 a 130 micras, presentan forma oval, esférica o poliédrica, con superficie lisa, rugosa o espiculada. Estructuralmente se compone de exina o cubierta protectora de la que salen los poros germinales.

Intina es la membrana interna compuesta de celulosa. La fóvula, masa coloidal central en la que se encuentran dos núcleos; generador y vegetativo, retículo endoplásmico y ribosomas, donde se encuentran enzimas, hormonas, pigmentos y vitaminas (2, 46).

1.1. Malezas: Son plantas silvestres, angiospermas, dicotiledóneas. Desde el punto de vista alergénico las más importantes en México son:

Nombre científico	Nombre común
<u>Helianthus annuus</u>	girasol, maíz de texas.
<u>Cosmos bipinnatus</u>	mirasol, girasol morado.
<u>Ambrosia elatior</u>	ambrosia
<u>Ambrosia psilostachya</u>	amargosa, altamisa
<u>Ambrosia trifida</u>	altamisa, artemisa, amargosa, canbeba
<u>Artemisia ludoviciana</u>	mexicana, estafiate, ajeno del país iztauyalt.
<u>Artemisia vulgaris</u>	estafiate
<u>Amaranthus hybridus</u>	quintonil, quelite blanco, cola de no via, cani.
<u>Amaranthus palmeri</u>	bledo
<u>Amaranthus retroflexus</u>	cresta de gallo, moco de guajolote
<u>Chenopodium ambrosoides</u>	epazote
<u>Chenopodium album</u>	quelite
<u>Rumex crispus</u>	lengua de vaca
<u>Rumex acetocella</u>	hierba roja, hierba de cristo, acederilla.
<u>Salsola pestifer</u>	rodadora, maromero, comunista, chamiso
<u>Atriplex bracteosa</u>	
<u>Plantago major</u>	llantén, uitssuacua-sipiati
<u>Plantago lanceolata</u>	ruderal.

1.2. Pastos: Angiospermas, monocotiledóneas. La familia de las gramíneas son de importancia alergénica.

Nombre científico

Nombre común

Cynodon dactylon

capriola, pata de gallo, pasto de las bermudas.

Lolium perenne

pasto inglés

Holcus halepensis

sorgo, zacate egipcio, maicillo zacate Jhonson.

Phleum pratense

cola de zorro, timoti.

Bromus carinatus

avena loca, barba de viejo, zacapipillo, pipilote, cabadillo.

Agrostis alba

zacate

Avena fatua

avenilla, avena, avena silvestre.

Zea mays

maíz.

1.3. Árboles: Angiospermas y gimnospermas. Arbustos o árboles de 1.0 a 87 metros de longitud.

Nombre científico	Nombre común
<u>Fraxinus uhdei</u>	Fresno
<u>Shinus molle</u>	pirú, purul, tzactumi, xasa, yagaleche
<u>Quercus glaucooides</u>	encino
<u>Quercus laurina</u>	encino, laurel
<u>Ligustrum vulgare</u>	trueno
<u>Prosopis juliflora</u>	mezquite, algarrobo, mizquitl, chacata
<u>Populus tremulooides</u>	álamo, alamillo
<u>Acer negundo</u> var. mexicanum	haya, acazintle
<u>Alnus glabrata</u>	allé, ilite
<u>Juniperus deppeana</u>	cedro, sabino
<u>Liquidambar styraciflua</u>	estiella, ocozote, suchiate, kirambaro
<u>Juglans sp</u>	nogal, nogal silvestre
<u>Acacia sp</u>	espino, huizache, chaparro prieto, flor de niño, tzurumbiri.
<u>Eucalyptus globulus</u>	eucalipto
<u>Olea europea</u>	olivo
<u>Pinus sp</u>	pino
<u>Salix sp</u>	sauce
<u>Ulmus mexicana</u>	olmo, palo de baqueta, guayacán, cue rillo.

Los pólenes de las plantas reportadas anteriormente se consideran alergénicos por cumplir con los postulados de Thomen Vaughan --- (1939):

1. El polen debe ser alergénico.
2. Liviano
3. Anemófilo
4. La planta debe producirlo en grandes cantidades.
5. Estar ampliamente distribuido.

b) MICROBIANOS.

Los ácaros son microorganismos pertenecientes a la familia --- Pyroglyphidae; con dos especies de importancia alérgica: Dermatophagoides pteronyssinus y D. farinae (dermatos: piel; phago: comer; oides: parecido a). Su fuente alimenticia son faneras, bacterias y esporas de hongos.

El hábitat de D. pteronyssinus es el polvo casero y de D. Farinae son las harinas y polvos (19).

Su temperatura de desarrollo es de 25°C, con humedad relativa - del 80%. Miden hasta 30 micras de longitud. En 1960 (Voor Horst) - quedó establecido que estos microorganismos son frecuentemente responsables de la rinitis y asma alérgica.

Chapman y cols. en 1980 purificaron y caracterizaron los principales alérgenos, denominados como P1 (Der P1) de 24000 d, AgX (Der PII) y Ag23 para D. pteronyssinus y F1 (Der F1) para D. farinae. Se ha demostrado que al menos 1 de los 4 alérgenos principales de D. farinae, comparte determinantes antigénicos con D. pteronyssinus (2,13,27,30,34).

4. ENFERMEDADES ALERGICAS

CLASIFICACION:

Actualmente algunas enfermedades alérgicas están incluidas en la respuesta de hipersensibilidad tipo I y se clasifican clínicamente en función de órgano de choque.

A continuación se describen las que involucran el tracto respiratorio debido a su mayor frecuencia en nuestra población.

4.1. RINITIS ALERGICA

Es una alergosis del tracto respiratorio inducida por aeroalergenos, primordialmente ataca la mucosa nasal, faringe.

La rinitis alérgica es la más frecuente y no tiene relación con la edad, sexo o raza. Depende de 3 factores: predisponente (atopía), desencadenante (alergeno) y medio ambiente.

Patogenia.

La rinitis alérgica sea estacional o perenne es inducida por la interacción entre un alergeno y la IgE específica fijada sobre las células cebadas de la mucosa nasal, provocando la liberación in situ de mediadores biológicamente activos, responsables de las manifestaciones fisiopatológicas, como: dilatación del lecho vascular y aumento de la permeabilidad capilar con formación de edema, estimulación de las glándulas mucosas y células caliciformes que producen rinorrea e infiltración de la submucosa y mucosa con células inmunocompetentes predominantemente eosinófilos.

Las manifestaciones clínicas incluyen prurito, siendo el síntoma más característico, obstrucción nasal producida por el edema de la mucosa con apariciones súbitas y remisiones espontáneas recidivantes que las diferencian de obstrucciones de origen anatómico, rinoorrea acuosa transparente; otras manifestaciones menos frecuentes son las "ojeras alérgicas", que se atribuyen a la estasis venosa crónica, debido al fluido venoso disminuido a lo largo de la mucosa edematosa, pliegue nasal transversal resultante del rascado crónico.

En pacientes con rinitis alérgica existe una elevada frecuencia de conjuntivitis. En la exploración física se observa la mucosa nasal pálida, azulada, húmeda y edematosa (35).

Diagnóstico.

El estudio completo del paciente incluye:

1. Historia clínica y exploración física completa.
2. Biometría hemática completa
3. Estudio coproparasitológico en serie.
4. Citología nasal y/o ocular.
5. Pruebas cutáneas
6. Radiografía de senos paranasales
7. Determinación de IgE total y/o específica.

Diagnóstico diferencial.

La rinitis alérgica se debe diferenciar de otras entidades clínicas como: rinitis vasomotora, rinitis no alérgica, síndrome de eosinofilia (RNASE), rinitis yatrogénica, rinitis estructural, rinosin-

sitis neutrofílica y rinitis intrínseca.

Tratamiento.

Incluye un conjunto de recursos que pueden complementarse entre sí:

1. Alivio sintomático
2. Control ambiental
3. Inmunoterapia

4.2. ASMA BRONQUIAL EXTRÍNSECA

Es una enfermedad de las vías respiratorias caracterizada por obstrucción del árbol traqueobronquial e inflamación. Fisiológicamente se manifiesta por estrechamiento generalizado del árbol bronquial y clínicamente por episodios paraxísticos de disnea, tos productiva y sibilancias.

Epidemiología.

El asma está presente en un 2% de la población general y 2 de cada 3 casos tienen su inicio en la primera década de la vida.

Patogenia.

En la mayor parte de los individuos atópicos, se presentan alteraciones inmunológicas, fisiológicas, neuroendócrinas que provocan hiperreactividad bronquial, debido a la respuesta excesiva beta-adrenérgica, colinérgica y alfa-adrenérgica (25).

Diagnóstico.

1. Historia clínica y exploración física completa.
2. Pruebas cutáneas.
3. Determinación de IgE total y específica.
4. Búsqueda de eosinófilos en expectoración.
5. Biometría hemática completa.
6. Exámen coproparasitoscópico en serie.
7. Pruebas de funcionamiento pulmonar.
8. Estudio radiológico de tórax y senos paranasales.
9. Exudado nasal y/o faríngeo.

Diagnóstico diferencial.

Tiene importancia fundamental diferencial entre asma y enfermedades respiratorias que cursen con obstrucción bronquial y que por su naturaleza etiológica, produce obstrucción de vías respiratorias y que no debe con broncodilatadores.

Tratamiento.

1. Profiláctico
2. Control del medio ambiente
3. Sintomático
4. Inmunoterapia
5. Rehabilitación

5. ESTANDARIZACION DE EXTRACTOS ALERGENICOS

5.1. EXTRACTOS ALERGENICOS.

Los extractos alérgicos son inmuoestimulantes parenterales - selectivos que reducen los síntomas alérgicos. Los alérgenos utilizados en el diagnóstico y tratamiento (inmunoterapia), de las enfermedades alérgicas; deben ser antigénicos e inoocuos en los pacientes sensibilizados (17).

Los extractos alérgicos son soluciones acuosas o glicerinadas preparados de una amplia variedad de materia prima con actividad alérgica demostrada. Se han caracterizado a las proteínas y glicoproteínas como las responsables de dicha actividad (17).

Conservadores. Estos inhiben el crecimiento bacteriano y fúngico en los extractos alérgicos, los más usados son el fenol, timersal y glicerina (17).

Adyuvantes. En el campo de la alergia el hidróxido de aluminio y la emulsión agua-aceite se han utilizado extensamente. Unicamente los antígenos adsorbidos en hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio - han sido aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA).

Estabilidad. Los extractos alérgicos son muy sensibles y pueden perder su potencia (actividad biológica), por diversos factores - como: pH, temperatura, presión, agitación, dilución, mezcla, conservadores. Los estabilizadores utilizados son: glicerol y álbumina sérica humana (17).

5.2. ESTANDARIZACION.

La aplicación de extractos alergénicos es un tratamiento que no obstante haber mostrado su eficacia, ha sido motivo de múltiples discusiones principalmente por falta de calidad y potencia conocida --- (1, 16).

Hace pocos años ha habido un progreso significativo en la caracterización de extractos alergénicos al igual que en su estandarización - principalmente por los avances inmunoquímicos y tecnología fisicoquímica. Existen varios métodos de estandarización.

5.2.1. Métodos cuantitativos.

a) Unidad Noon. Fué introducida por Noon en 1911 y se define como la cantidad de material alergénico extraído de un microgramo de polen seco (Phleum), equivalente a 1,000.000 U/noon. Este sistema pre-presenta claras limitaciones. En primer lugar es restrictivo al Phleum. Existe variación en la concentración de alérgeno que depende de la fecha de recolección y procedimientos de extracción (33, 40).

b) Relación peso/volumen. Ha sido una forma tradicional de valora-ción definida por la expresión peso/volumen equivalente a una canti-dad de materia prima (en peso seco) en una cantidad fija de solución extractora suponiendo que un determinado peso de materia prima seca -- siempre poseé la misma potencia alergénica; básicamente es una aplica-ción de la forma anterior y presenta los mismos inconvenientes. Así Voorhorts y cols. demuestran que la alergenicidad del polvo doméstico está relacionado con el contenido de áceros que está en relación con la altitud, entre otros (33, 41, 60, 61).

c) Unidades de nitrógeno proteico (PNU). Una vez conocida la naturaleza proteica o glicoproteica de los alérgenos, Stull y cols. introducen en 1933 las unidades de nitrógeno proteico. Así establecen que 10^{-5} mg de nitrógeno proteico precipitado con ácido fosfotungstínico equivalen a un PNU. Este sistema representó un gran avance sobre los anteriores y supone que la valoración de las proteínas de un extracto será reflejo de su potencial alérgico. Este sistema no correlaciona con la actividad biológica del extracto --- (5, 6, 17, 37, 53).

d) Inhibición del RAST. En el RAST directo se determina la concentración de IgE específica contra el alérgeno. En la primera etapa el alérgeno covalentemente unido a la fase sólida (celulosa o papel filtro), reacciona con la IgE contenida en el suero de un individuo alérgico. El complejo alérgeno anticuerpo es lavado para eliminar otras inmunoglobulinas y anticuerpos IgE no específicos. En la segunda etapa, el complejo reacciona con anticuerpos marcados radioactivamente y purificados por cromatografía de alta afinidad, dirigidos contra la IgE. Después de lavar para eliminar el exceso de anticuerpos marcados que no reaccionaron, se mide la radioactividad con un contador gama. La cantidad de ésta es relacionada con una muestra de referencia para cuantificar el anticuerpo IgE del alérgeno cuestión.

En el año de 1974, Gleich y cols. ponen de manifiesto las discrepancias entre los sistemas de estandarización existentes, asignan una potencia alérgica a los extractos utilizados para el diagnóstico y tratamiento empleando para ello la inhibición del RAST que determina

que concentración de extracto alergénico inhibe el 50% de enlaces entre la IgE y el antígeno en fase sólida en la primera etapa del RAST (4, 5, 20, 23, 24, 32, 33).

En este estudio se utilizó una modificación del RAST (Phadezym RAST). El alergeno de interés unido covalentemente a discos de papel reacciona con la IgE específica. Después de lavar el complejo éste reacciona con la anti-IgE conjugada con la enzima beta-galactosidasa, después de un segundo lavado la enzima se activa por la adición de la sustancia reductora glutatión y reacciona con el sustrato o-nitrofenil-beta galactosido. La hidrólisis enzimática se detiene por adición de carbonato de sodio para formar un producto final colorido que es directamente proporcional a la concentración de IgE específica y se mide la absorvencia a 405 nm (10).

e) Unidades biológicas. El RAST por sí solo no refleja directamente la potencia alergénica por lo que se realiza en conjunto con pruebas biológicas in vivo e in vitro y así valorar la verdadera potencia de los extractos y expresar la misma en unidades biológicas las cuales son más reproducibles.

Unidades de Punción de Histamina (HEP). Fue propuesta por Ass en 1978, se define como la concentración de extracto alergénico que produce la histamina en concentración de 1 mg/ml (1 HEP), por definición tendrá una potencia de 1000 unidades biológicas (UB) (47).

Para la estandarización de un extracto por este sistema se requiere entre 20 y 30 individuos que reúnan las siguientes características:

- a) Historia clínica de enfermedad alérgica compatible con el alérgeno a probar.
- b) Diámetro de la roncha a la histamina de 4 mm. o más.
- c) Ausencia de previa inmunoterapia al alérgeno en cuestión o al gún otro con actividad cruzada.
- d) Mayor de 15 años de edad.
- e) No haberse administrado antihistamínicos u otros fármacos antialérgicos previamente al ensayo.

La prueba de punción se realiza por duplicado y a una distancia no menor de 2 cm. en la espalda o antebrazo del paciente utilizando de preferencia 5 diluciones del extracto alérgico. Como control positivo se emplea histamina 1 mg/ml y solución de Evans de control negativo. La lectura de la roncha se realiza con la ecuación ---
 $D+d/2$. De este modo la dilución del extracto que corresponda a la obtenida con la histamina en términos de diámetro de roncha o áreas, representa las 1000 UB (4, 11, 36, 59).

f) Liberación de histamina (LH). La liberación de histamina de los leucocitos de un individuo alérgico es una prueba in vitro para el diagnóstico de hipersensibilidad tipo I. Si se asume que la cantidad de histamina liberada correlaciona con la cantidad de alérgeno al que se exponen los leucocitos, la cantidad de histamina liberada puede utilizarse para medir la actividad del extracto alérgico.

La LH se lleva a cabo a 37°C durante 40 minutos. El contenido

de histamina total se determina por lisis con ácido perclórico y la cantidad de histamina se mide por técnicas fluorométricas.

La actividad alergénica se expresa como la relación de proteínas (ug/ml) necesarias para liberar el 50% de histamina en una curva de dosis-respuesta (17, 47, 50, 51).

La histamina liberada por la actividad de los alérgenos puede ser comparada con la capacidad de estos para inhibir el 50% del RAST (3, 40).

g) Análisis enzimático. Muchos extractos alergénicos han mostrado en estudios recientes que contienen enzimas, la actividad enzimática es potencialmente útil para medir la cantidad de enzima en un extracto crudo. Para un alérgeno que contenga una enzima es posible desarrollar una prueba basada en la actividad enzimática. Sin embargo este método de estandarización no puede ser aplicado a la mayoría de los extractos alergénicos excepto a los venenos de himenópteros (17).

5.2.2. Métodos cualitativos.

Métodos de apoyo para la caracterización de extractos alergénicos.

a) Inmunodifusión radial (RID). En la técnica de Mancini el área de difusión formada por el antígeno precipitado por el anticuerpo monoespecífico contenido en el gel, puede correlacionarse con la cantidad de antígeno aplicado. La precisión, exactitud y sensibilidad son aceptables para el control de calidad de los extractos alergénicos.

La cuantificación puede realizarse relacionándolo a un estándar o a un lote de reactivos estables. Se ha utilizado para el control de alérgenos mayores de Ambrosia elatior (AgE, AgRa3), - D. pteronyssinus (p1), y el Ag25 de Phelum pratense (17).

b) Inmunolectroforesis. La podemos dividir en dos fases, en donde la fase 1 se produce una electroforesis del Ag en el agar de gel en la fase 2 se produce un corte transversal en el agar y es llenado con el Ac y dado que el Ag difunde radialmente en un punto y el Ac lo hace desde el corte en un plano frontal, se reúnen en - proporciones óptimas para la precipitación a lo largo de un arco.

Nos es útil para la identificación de antígenos por su movilidad electroforética y nos proporciona una información semicuantitativa respecto a la concentración de inmunoglobulinas.

c) Contraimunolectroferesis. Es una electroforesis en gel de agarosa seguida de electroforesis perpendicular. Se realiza bajo condiciones experimentales, donde los precipitados están formados por todos los antígenos contra los cuales se encuentran anticuerpos en concentraciones equivalentes en el gel.

Las áreas delimitadas por los precipitados se correlacionan con la concentración de antígenos individuales. La precisión y exactitud son comparables a la RID excepto en sensibilidad, la cual es 10 veces menor en esta última.

No hay diferencias principales entre RIE y CIE excepto en la sensibilidad, la cual puede ser superada realizando el CIE en proporciones diferentes entre antígeno y anticuerpo.

Es importante saber que la utilización de estos métodos es para comparación cualitativa.

Radiocontrainmunolectroforesis (CRIE). El CRIE identifica alérgenos en una mezcla, técnicamente se desarrolla después del CIE donde el suero de pacientes alérgicos se añade a precipitados nativos y los antígenos unidos a inmunoglobulinas son identificados por adición de anti-IgE marcada con I^{125} . Estos métodos pueden ser utilizados cuantitativamente cuando la identidad de un alérgeno es dudosa en el sistema CIE o cuando únicamente hay pequeñas cantidades de precipitado teñido con colorante azul de cromasil, pero el sistema es utilizado preferentemente para la identificación de alérgenos similares en dos especies diferentes de un mismo género sobre todo en aceros, pólenes y hongos (17).

6. OBJETIVOS

GENERALES:

- a) Mejorar el control de calidad de los extractos alérgicos utilizados en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades alérgicas.

PARTICULARES:

- a) Estandarización química.

- i - determinación de nitrógeno proteico.

- b) Estandarización biológica.

- i - in vivo: Punción Equivalente de Histamina (HEP).

- ii - in vitro: inhibición del 50% de la prueba radioalérgica sorbente (RAST).

- c) Determinar la correlación existente entre el nitrógeno - proteico y las unidades biológicas.

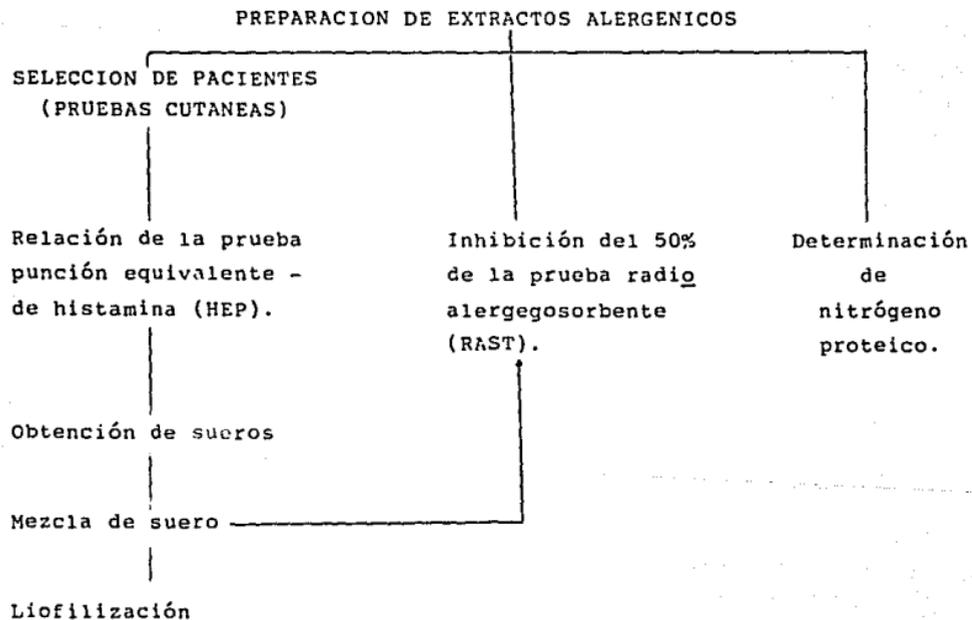
7. HIPOTESIS

Desde el punto de vista cuantitativo la técnica de PNU, Unidades HEP y la Inhibición del RAST tienen mayor precisión y exactitud para medir el potencial inmunogénico de los extractos utilizados en el diagnóstico de alergia, que el método de peso/volumen debido a que éste último presenta variación en la concentración de alergen.

Como los antígenos de los alergenos son principalmente de carácter proteico, debe de existir correlación entre las unidades de inhibición del RAST y el PNU.

8. METODOLOGIA

DIAGRAMA DE FLUJO



8.1. MATERIAL Y REACTIVOS

Matraces de Kjeldhal de 30 ml.
Matraces Erlenmeyer de 125 ml.
Matraces Kitasoto de 250 y 500 ml.
Matraces aforados de 100, 500 y 1000 ml.
Membranas de celulosa.
Membranas millipore de 0.45 y 0.22 micras.
Buretas de 0.25 y 50 ml.
Pipetas graduadas de 1.0 y 10 ml.
Pipetas volumétricas de 1.0, 5.0 y 10 ml.
Probetas de 50, 100 y 500 ml.
Picetas de 500 y 1000 ml.
Pipetas pasteur
Papel parafill
Pinzas para soporte
Soporte universal
Filtros AP-25 y AP-15
Vasos de precipitados de 100 y 200 ml.
Agitador de vidrio
Jeringas de 1.0, 3.0 y 10 ml.
Jeringas de insulina o tuberculina
Lancetas calibradas de 0.01 cm.
Gradillas
Tubos de ensaye de 13 x 100

Frascos ámbar de 100, 500 y 1000 ml.

Cajas de Petri

Espátula de acero

EQUIPO

Destilador Labconco

Equipo de Kjeldhal

Pipetas de 25 y 50 microlitros

Balanza granataria

Balanza analítica

Potenciómetro Beckman

Bomba de vacío

Centrífuga clínica

Rotor

Espectrofotómetro

Cronómetro

Incubadora

Equipo millipore

Liofilizadora Labconco

REACTIVOS

Sulfato de cobre

Oxido de selenio

Acido sulfúrico concentrado

Acido fosfórico

Acido bórico

Acido clorhídrico

Acetona
Rojo de metilo
Verde de bromocresol
Fenolftaleína
Etanol
Cloruro de sodio
Difosfato de sodio dodecahidratado
Fosfato de potasio dibásico
Cloruro de histamina
Kit de Pharmacia para la determinación de IgE específica.
Alergenos de Biopol Laboratory
Agua destilada
Materil biológico. Suero humano

8.2. PREPARACION DE EXTRACTOS ALERGENICOS

La materia prima como Cynodon dactylon (capriola), Amaranthus palmeri o Fraxinua americana (fresno) es desengrasada de dos a tres veces con éter o acetona después del macerado con la solución extractante, se pasa por filtros millipore, se mide el pH y se procede a dializar contra solución de Evans ajustando el pH entre 6.80 y 7.20.

Esterilizar el extracto con equipo millipore y realizar las pruebas de esterilidad, sembrando 0.1 ml. en el medio caldo de soya tripticaseína y 0.1 ml. en tioglicolato. Se incuban los tubos a 37°C durante 3, 7 y 15 días.

8.3. SELECCION DE PACIENTES (PRUEBAS CUTANEAS)

Una vez especificadas las características del paciente se procede a:

1. La cara externa del antebrazo del paciente se desinfecta con alcohol.
2. Con una jeringa de insulina o tuberculina se administra el alérgeno a una distancia no menor de 2 cm. una de la otra (se utiliza una jeringa estéril para cada alérgeno).
3. Administrar histamina como control positivo.
4. Administrar solución de Evans como control negativo.
5. Los volúmenes y concentraciones que se aplican son los siguientes:

	VOLUMEN	CONCENTRACION
Dermatophagoides farinae	0.1 ml.	1:10,000
Dermatophagoides pteronyssinus	0.1 ml.	1:10,000
Amaranthus palmeri	0.1 ml.	1:1000
Cynodon dactylon	0.1 ml.	1:1000
Fraxinus americana	0.1 ml.	1:1000
Histamina	0.1 ml.	1:1000
Evans	0.1 ml.	-----

6. Después de 15 minutos se realiza la lectura en relación a los testigos con el siguiente criterio:

Edema.....	Una cruz (+)
Edema y eritema.....	Dos cruces (++)
Edema pronunciado con pseudópodos ligeros y eritema mayor de 1 cm.....	Tres cruces (+++)
Edema exagerado con pseudópodos y eritema pudiendo ocupar otras áreas.....	Cuatro cruces(++++)
La pápula desaparece o no incrementa su tamaño en relación al control.....	Negativa (-)
Eritema menor de 0.5 cm. o ligera área de enrojecimiento, recomendable repetir.....	(- +)

8.4. PUNCIÓN EQUIVALENTE DE HISTAMINA (HEP)

1. Una vez seleccionados los pacientes que presentaron sensibilidad de 3 o más cruces al alérgeno a estandarizar, se desinfecta con alcohol la espalda o la cara anterior de los brazos.
2. Para identificar la zona donde se administrará cada dilución se marca con un bolígrafo, al igual que para la dilución de histamina.
3. Las diluciones de los alérgenos y de la histamina se administrarán en ambos brazos pero en sentido inverso (mismas dil.).
4. Se coloca una gota de cada dilución del extracto y de la dilución de histamina mediante un capilar sin anticuagulante.
5. Se hace una punción de manera rápida y precisa, utilizando una lanceta calibrada para cada dilución.

6. Después de 15 minutos de la punción, se delimita el área de la roncha producida, con un bolígrafo.
7. Se toma una muestra de sangre para obtener el suero que se liofiliza para utilizarse en la prueba de inhibición del RAST.
8. Se calcula el área de la roncha producida tanto para las diluciones del extracto como el de la histamina.
9. Se procede a graficar el área contra las diluciones, para obtener las unidades HEP.

8.5. INHIBICION DEL RAST

1. En nueve tubos de ensaye colocar un disco con el antígeno apropiado y numerarlos como diluciones 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/5000, 1/10,000, 1/100,000 y 1/1,000,000.
2. En otro tubo colocar un disco y marcarlo como suero medio.
3. Colocar en un tubo de ensaye un disco y marcarlo como mezcla de sueros.
4. A los tubos del inciso 1 agregarles 25 microlitros de la mezcla de sueros.
5. Al tubo de suero medio agregar 25 microlitros de la mezcla de sueros en cuestión y 25 microlitros de solución isotónica.
6. Al tubo de inciso 3 adicionarle 50 microlitros de la mezcla de sueros.

7. A los tubos del paso 1 agregarles 25 microlitros de las diluciones correspondientes del antígeno.
8. Cubrir los tubos con papel parafill, incubarlos a temperatura ambiente por 3 horas.
9. Lavar 3 veces cada una con 2 ml. de solución de lavado y secar perfectamente.
10. Añadir 25 microlitros del conjugado enzima-anti IgE a cada tubo.
11. Cubrir e incubar los tubos a temperatura ambiente por 16-20 hrs.
12. Lavar 3 veces con 2 ml. de solución de lavado y secar perfectamente después del último lavado.
13. Añadir 200 microlitros del sustrato a cada tubo y a un tubo vacío como blanco.
14. Cubrir con papel parafill e incubar exactamente 2 horas a 37°C.
15. Agregar a cada tubo incluyendo al blanco 1 ml. de solución frenadora en el mismo orden y velocidad en el que se adiciona el sustrato mezclando perfectamente.
16. Medir la absorbancia a 405 nm.
17. Realizar los cálculos necesarios.

8.6. DETERMINACION DE NITROGENO PROTEICO

1. Tomar de 0.2 a 0.4 ml. de la muestra del extracto alergénico - y se coloca en un matraz de Kjeldhal y se le añade de 1 a 2 ml. de mezcla digestora, correr al mismo tiempo un blanco de sacarosa.
2. Llevar a digestión hasta que la muestra presente un aspecto claro.
3. Si el inciso anterior no se cumple, detener la digestión, enfriar el sistema y adicionar de 5 a 10 ml. de agua destilada lavando - las paredes del matraz y se continúa la digestión.
4. Si la muestra presenta el aspecto claro, detener la digestión, - enfriar y agregar de 1 a 2 ml. de agua destilada.
5. Proceder a la destilación.
6. Vaciar la muestra por la copa del destilador y dejarla fluir hacia el matraz, enjuagar con 1-2 ml. de agua destilada.
7. En la copa del destilador se colocan 5 ml. aproximadamente, de hidróxido de sodio al 60%.
8. Se calienta el sistema y se añade lenta pero continuamente el -- hidróxido de sodio.
9. El destilado se recibe en un matraz Erlenmeyer que contenga aproximadamente 40 ml. de solución de ácido bórico.

10. Se suspende la destilación cuando se tenga un volumen de aproximadamente de 80 ml., en este paso la solución de ácido bórico vira de color.
11. Titular con ácido clorhídrico 0.01 N.
12. Calcular el porcentaje de nitrógeno proteico con la siguiente fórmula:

$$\% N = \frac{(B-P) N 0.014}{m} 100$$

Donde:

% N: porcentaje de nitrógeno proteico.

B: ml. de ácido clorhídrico gastados en la titulación del blanco.

P: ml. de ác. clorhídrico consumido en la titulación del problema.

N: Normalidad del ác. clorhídrico.

0.014: miliequivalentes del nitrógeno.

m: peso de la muestra.

6.7. PRUEBA ESTADISTICA

Distribución "t"

La distribución fué estudiada por Willian Sealy Gosset en 1908 y perfeccionada por R. A. Fisher en 1924.

Esta distribución es muy útil para el estudio de muestras pequeñas, es decir, cuando n es menor de 60. Cuando la muestra es muy grande de 120 o más observaciones, la distribución "t" es prácticamente normal e igual a la distribución "Z".

Las características de la distribución "t" son:

- a) La curva es simétrica, de forma muy similar a la curva normal, especialmente si n (tamaño de la muestra) es grande.
- b) La media es cero.
- c) La forma de curva y el valor de "t" están relacionados con el valor de n y con los grados de libertad (61, 62).

Correlación y regresión lineal simple.

La correlación simple estudia la variación simultánea de dos variables, indica aquellos casos en que los cambios de una variable van asociados con cambios de otra variable, existiendo una relación concreta entre dichas variables.

Coefficiente de correlación. Es un valor que indica el grado de asociación entre dos variables. Varios casos son posibles:

- a) El valor del coeficiente de correlación es cero o estima a cero. Las variables son independientes, no hay correlación.
- b) El valor del coeficiente es +1 ó -1. Hay correlación positiva o negativa y perfecta, respectivamente.
- c) Valores de cero a +1 y de cero a -1 sugieren cierto grado de asociación. Si la muestra fué tomada al azar de una población será necesario plantear y probar la hipótesis de - que dicha muestra fué tomada de una población cuyas variables o caracteres están correlacionados (61, 62).

9) R E S U L T A D O S.

PUNCIÓN EQUIVALENTE DE HISTAMINA (EJEMPLO)

Alergeno utilizado: Praxinus americana
 Nombre del paciente: Gonzales O. Blasas
 Edad: 19 años

R	U	F	H	A	S	Dilución	D	$\frac{D-d}{2}$	$A \cdot D^2$
						1:1000 Histamina		3.25	10.56
						1:10		9.75	95.06
						1:50		6.75	45.56
						1:100		6.50	42.25
						1:500		3.00	9.00
						1:1000		2.50	5.06
						1:5000		2.00	4.00
						1:10000		1.0	1.0

Donde:

- D Diámetro medio (mm) de la roncha
- D Diámetro horizontal (mm) de la roncha
- d Diámetro vertical (mm) de la roncha
- A Área media de la roncha (M^2).

Dermatophagoides pteronyssinus.

En la tabla 1 se muestran los valores de las ronchas (mm²) producidas por la histamina 1:1000 y las diluciones del extracto alergénico utilizado, en el antebrazo de los 30 pacientes sensibles al hacer la gráfica de — las áreas medidas de las ronchas contra el logaritmo de las diluciones utilizadas se obtiene la curva correspondiente a la Punción Equivalente de Histamina (HEP). En la gráfica 1 se observa que la área medida de la roncha producida por la histamina 1:1000 fue de 24.42 mm², interpolando en la curva correspondiente al HEP y tomando el antilogaritmo se obtuvo la dilución 1:301.49 de extracto alergénico que equivale a 1 HEP — (Gráfica 1)

La dilución que inhibió el 50% del RAST fue de 1:239. Esta dilución se obtuvo considerando la lectura de absorbancia de la última dilución como el 100%. La dilución 1:239 también equivale a 1 HEP (Gráfica 2).

El contenido de nitrógeno proteico fue de 1.2% .

TABLA I

DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSUS

PUNCIÓN EQUIVALENTE DE HISTAMINA

- ÁREAS DE LAS RONCHAS MM² -

NÚMERO	HISTAMINA DILUCIÓN DEL EXTRACCIÓN ALERGENICO									
	1:1000	1:10	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:5000	1:10EX4	1:10EX5	1:10EX6
1	30.25	76.56	36.00	33.48	30.25	16.00	12.25	6.25	7.25	-----
2	72.25	138.06	132.25	102.70	110.25	56.25	39.16	23.71	30.25	-----
3	27.56	33.06	22.56	16.00	16.00	14.00	12.25	9.00	-----	-----
4	12.25	95.06	68.06	45.56	25.00	20.25	4.00	-----	-----	-----
5	25.00	120.56	72.25	45.25	25.00	16.00	4.00	-----	-----	-----
6	16.00	84.00	42.56	44.00	27.56	9.00	7.56	-----	-----	-----
7	14.06	52.56	12.25	10.56	9.00	6.25	-----	-----	-----	-----
8	27.56	20.25	10.56	10.56	10.56	6.25	-----	-----	-----	-----
9	12.25	39.06	22.56	9.00	2.25	-----	-----	-----	-----	-----
10	36.00	95.06	110.25	90.25	49.00	12.25	9.00	-----	-----	-----
11	22.56	25.00	12.25	2.00	7.56	-----	-----	-----	-----	-----
12	9.00	70.25	19.00	30.25	16.00	-----	-----	-----	-----	-----
13	22.56	20.25	12.25	6.25	4.00	3.00	-----	-----	-----	-----
14	14.06	31.00	45.56	25.00	7.56	1.00	-----	-----	-----	-----
15	33.06	115.56	33.06	30.25	9.00	3.00	2.25	-----	-----	-----
16	49.00	105.56	32.06	36.00	14.00	6.25	-----	-----	-----	-----
17	16.00	42.25	16.00	12.25	6.25	2.25	-----	-----	-----	-----
18	9.00	45.56	52.52	25.00	9.00	2.25	-----	-----	-----	-----
19	9.00	27.56	10.56	9.00	4.00	-----	-----	-----	-----	-----
20	33.06	12.25	9.00	9.00	2.25	-----	-----	-----	-----	-----
21	12.25	26.56	33.06	12.25	3.00	-----	-----	-----	-----	-----
22	9.00	33.06	18.06	12.25	10.56	-----	-----	-----	-----	-----
23	20.25	121.00	81.00	42.25	36.00	9.00	2.25	-----	-----	-----
24	20.25	26.56	72.25	64.00	32.06	25.00	22.56	14.06	12.56	6.25
25	16.00	121.00	69.00	64.00	12.25	4.00	2.25	-----	-----	-----
26	20.25	100.00	33.06	18.06	10.56	6.25	4.00	-----	-----	-----
27	33.06	20.15	14.06	11.00	9.00	6.25	-----	-----	-----	-----
28	42.25	50.25	33.06	25.00	10.25	9.00	4.00	-----	-----	-----
29	56.25	169.00	118.25	68.06	49.00	27.56	16.00	-----	-----	-----
30	27.56	25.00	12.25	12.25	9.00	7.56	6.25	-----	-----	-----
\bar{x}	24.97	78.25	48.51	32.23	19.12	10.61	9.84	-----	-----	-----

NOTA : LOS ESPACIOS MARCADOS * ----- * INDICAN QUE NO HAY RESPUESTA

TABLA 2

Dermatophagoides pteronyssinus

Punción equivalente de histamina

Dilución del extracto

X	Log. X	Y	Area (mm ²) Yc
1:10	1.0	78.25	73.209
1:50	1.69	48.51	50.466
1:100	2.0	32.23	40.248
1:500	2.69	19.12	17.506
1:1000	3.0	10.61	7.288

r 0.9811 m 32.96 b 106.169

Inhibición de la prueba radioalergosorbente

Dilución del extracto

Absorbancia (405 mμ)

X	Log. X	Y	Yc
1:10	0.69	0.021	0.017
1:50	1.69	0.049	0.052
1:100	2.0	0.068	0.082
1:500	2.69	0.110	0.126
1:1000	3.0	0.150	0.146
1:5000	3.69	0.185	0.190
1:10,000	4.0	0.232	0.210

r 0.9815 m 0.064 b 0.046

Determinación de nitrógeno proteico

ml de extracto

ml de HCl 0.01136 N

1.5	1.1
2.9	1.3
1.0	1.3
1.5	1.0
TOTAL 6.9	4.7

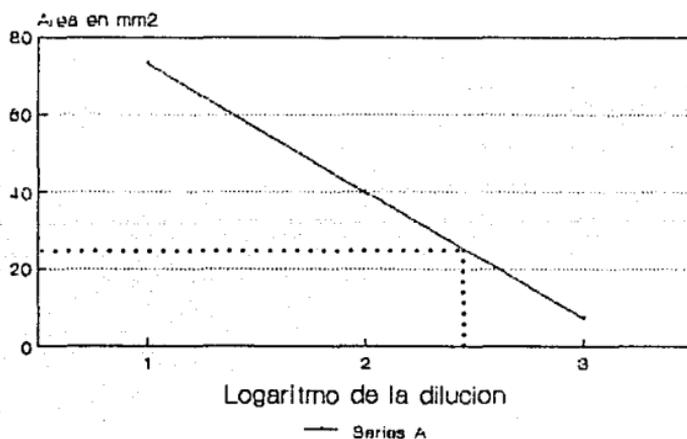
% de Nitrógeno proteico 1.2

Donde:

- X Dilución del extracto alergénico
- Yc Valores corregidos por regresión lineal
- r Coeficiente de correlación lineal
- m Pendiente de la línea recta
- b Ordenada al origen

GRAFICA 1

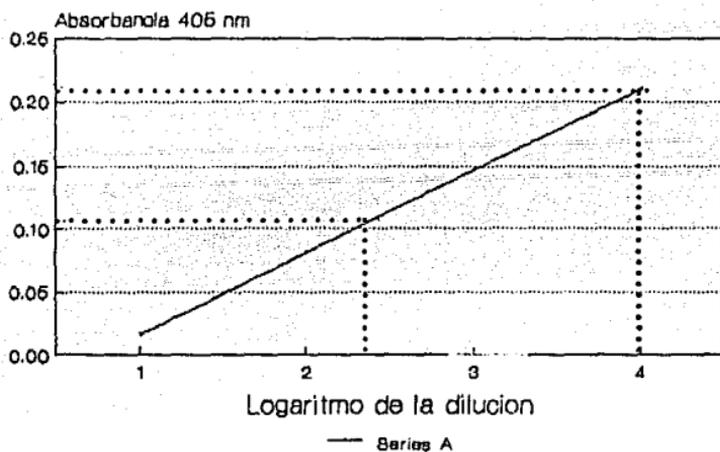
PUNCION EQUIVALENTE DE HISTAMINA



DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS

GRAFICA 2

| INHIBICION DE LA PRUEBA RADIOALERGOSORBENTE |



DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS

Dermatophagoides farinae .

La gráfica 3 correspondiente a la curva de IEP, obtenida al graficar las medidas de las áreas de las ronchas contra el logaritmo de la dilución. La área media de la roncha producida por la histamina 1:1000 fue de 30.16 mm² obteniéndose la dilución de extracto alergénico de 1:229.08 correspondiente a 1 IEP.

El 50% de inhibición del RAST se obtuvo con la dilución 1:63.09

Contenido de nitrógeno proteico: 0.85% .

TABLA 3

DERMATOPHAGOIDES FARINAE

PUNCIÓN EQUIVALENTE DE HISTAMINA

- ÁREAS DE LAS RONCHAS mm² -

NÚMERO	HISTAMINA	DILUCIÓN DEL EXTRACTO ALERGENICO								
		1:1000	1:10	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:5000	1:100X5	1:100X5
1	39.06	109.56	97.16	33.05	20.25	14.97	-----	-----	-----	-----
2	21.16	64.55	22.56	16.81	11.35	8.23	-----	-----	-----	-----
3	31.36	120.24	10.25	52.56	7.56	-----	-----	-----	-----	-----
4	50.69	113.06	61.93	43.81	14.97	11.35	2.62	-----	-----	-----
5	8.33	120.02	31.00	34.45	6.25	7.26	7.00	-----	-----	-----
6	16.97	14.06	6.85	5.85	3.49	0.25	-----	-----	-----	-----
7	14.06	275.06	81.00	33.05	6.25	4.00	1.67	-----	-----	-----
8	36.00	78.67	68.05	58.06	30.25	26.21	16.91	9.37	9.37	6.25
9	19.06	19.06	12.25	11.36	5.06	-----	-----	-----	-----	-----
10	11.05	16.00	14.19	9.00	4.00	1.00	-----	-----	-----	-----
11	47.19	116.00	100.00	52.56	30.25	19.09	-----	-----	-----	-----
12	30.25	65.95	39.00	47.19	18.06	16.00	-----	-----	-----	-----
13	16.29	14.06	3.23	5.61	2.62	-----	-----	-----	-----	-----
14	26.21	74.17	49.00	33.87	9.00	4.00	-----	-----	-----	-----
15	37.45	121.00	49.00	43.52	21.34	19.09	-----	-----	-----	-----
16	36.00	28.83	13.10	6.25	-----	-----	-----	-----	-----	-----
17	30.25	120.06	70.05	61.93	31.58	-----	-----	-----	-----	-----
18	33.05	95.06	78.67	43.83	18.00	14.06	12.25	-----	-----	-----
19	30.25	50.69	47.25	45.56	9.00	8.23	4.00	-----	-----	-----
20	28.87	129.00	54.31	33.05	15.06	-----	-----	-----	-----	-----
21	13.10	60.06	18.06	16.00	5.60	-----	-----	-----	-----	-----
22	37.50	34.45	19.14	11.39	9.00	6.89	-----	-----	-----	-----
23	49.00	80.55	70.05	31.59	9.36	9.73	-----	-----	-----	-----
24	22.55	28.83	13.10	10.55	6.25	4.00	4.00	-----	-----	-----
25	19.06	22.56	14.05	13.14	12.25	12.25	-----	-----	-----	-----
26	40.60	64.00	47.19	39.06	19.09	19.09	25.00	12.25	12.25	9.00
27	40.64	102.50	76.56	76.56	28.83	28.83	-----	-----	-----	-----
28	26.26	18.06	11.36	9.00	1.00	1.00	-----	-----	-----	-----
29	34.43	19.09	14.97	14.06	10.89	10.56	-----	-----	-----	-----
30	18.06	72.25	64.00	45.56	12.25	10.56	-----	-----	-----	-----
X	30.16	74.47	45.05	31.30	14.39	11.18	8.53	-----	-----	-----

NOTA : LOS ESPACIOS MARCADOS * ----- * INDICAN QUE NO HAY RESPUESTA

TABLA 4

Dermatophagoides farinae

Función Equivalente de Histamina

Dilución del extracto

X	Log. X	Y	Area (mm ²) Yc
1:10	1.0	74.47	63.40
1:50	1.69	43.037	46.51
1:100	2.0	31.30	38.92
1:500	2.69	14.39	22.03
1:1000	3.0	11.18	14.45

r 0.9384 m 24.47 b 87.88

Inhibición de la prueba radioalérgica

Dilución del extracto

Absorbancia (405 nm)

X	Log. X	Y	Yc
1:5	0.69	0.042	0.033
1:10	1.0	0.044	0.043
1:50	1.69	0.060	0.064
1:100	2.0	0.069	0.074
1:500	2.69	0.094	0.095
1:1000	3.0	0.098	0.105
1:5000	3.69	0.126	0.126
1:10,000	4.0	0.147	0.136

r 0.9856 m 0.0311 b 0.0119

Determinación de nitrógeno proteico.

ml de extracto

ml de HCl 0.01136 N

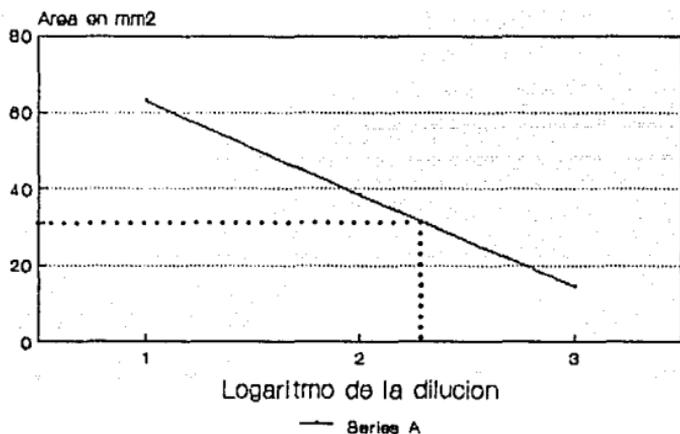
2.0	1.0
2.0	0.9
2.0	0.8
TOTAL 6.0	2.7

% de nitrógeno proteico 0.85

Donde:

- X Dilución del extracto alérgico
- Yc Valores corregidos por regresión lineal
- r Coeficiente de correlación lineal
- m Pendiente de la línea recta
- b Ordenada al origen

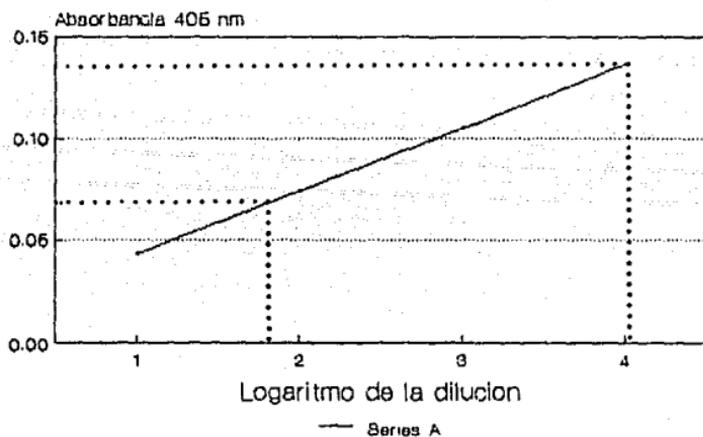
GRAFICA 3 PUNCION EQUIVALENTE DE HISTAMINA



DERMATOPHAGCIDES FARINAE

GRAFICA 4

INHIBICION DE LA PRUEBA RADIOALERGOSORBENTE



DERMATOPHAGOIDES FARINAE

Cynodon dactylon.

La dilución obtenida con la área media de la roncha producida por la histamina 1:1000 (27.64 mm²) en la curva de HEP fue de 1:13.18 (1 HEP) que equivale en la prueba del 50% de inhibición del RAST a la dilución 1:239.80 de extracto alérgico (Gráficas 5 y 6)

El porcentaje de nitrógeno proteico fue de 0.533

TABLA 5

CYNODON DACTYLON
 FUNCIÓN EQUIVALENTE DE HISTAMINA

- ÁREAS DE LAS PUNCHAS MM² -

NÚMERO	HISTAMINA DILUCIÓN DEL EXTRACTO ALERGÉNICO										
	1:1000	1:10	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:5000	1:10000	1:100000	1:1000000	1:10000000
1	30.25	60.06	45.56	33.06	30.25	16.00	-----	-----	-----	-----	-----
2	28.00	7.56	4.00	3.08	3.08	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	60.06	25.00	25.00	18.08	10.56	5.06	1.00	-----	-----	-----	-----
4	9.00	5.06	4.00	2.25	1.00	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	20.25	16.00	6.25	5.06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6	14.06	20.25	4.00	2.25	1.00	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7	16.00	20.25	12.25	9.00	6.25	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	16.00	22.56	10.56	6.25	5.06	5.06	4.00	4.00	-----	-----	-----
9	20.25	9.00	4.00	3.08	1.00	-----	-----	-----	-----	-----	-----
10	53.06	25.56	60.06	59.06	30.25	14.06	-----	-----	-----	-----	-----
11	15.06	9.00	6.25	5.06	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
12	53.06	156.25	72.25	64.00	25.00	16.00	-----	-----	-----	-----	-----
13	43.25	46.25	45.56	20.25	20.25	9.00	-----	-----	-----	-----	-----
14	33.00	16.00	6.25	4.00	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
15	29.33	10.56	9.25	9.00	12.25	6.25	-----	-----	-----	-----	-----
16	49.00	59.06	28.89	19.13	13.14	6.89	-----	-----	-----	-----	-----
17	33.20	69.00	55.00	30.00	19.00	10.00	-----	-----	-----	-----	-----
18	31.00	59.00	40.20	35.10	25.37	15.00	-----	-----	-----	-----	-----
19	8.99	10.38	8.55	6.20	3.13	1.11	-----	-----	-----	-----	-----
20	30.25	60.06	43.23	30.50	21.58	14.07	-----	-----	-----	-----	-----
\bar{x}	27.64	37.39	24.63	17.36	13.47	9.87	-----	-----	-----	-----	-----

NOTA: LOS ESPACIOS MARCADOS * ----- * INDICAN QUE NO HAY RESPUESTA

TABLA 6

Cynodon dactylon

Punción Equivalente de Histamina

Dilución de extracto

X	Log. X	Y	Area (mm ²) Yc
1:10	1.0	37.339	28.596
1:50	1.69	29.632	22.248
1:100	2.0	17.368	19.395
1:500	2.69	13.420	13.047
1:1000	3.0	9.87	10.195
r 0.989	m 9.20	b 37.79	

Inhibición de la prueba radioalergosorbente

Dilución del extracto

X	Log. X	Y	Area (mm ²)
1:5	0.69	0.095	-1.38x10
1:10	1.00	0.02	0.0048
1:50	1.69	0.012	0.0180
1:100	2.00	0.013	0.0248
1:500	2.69	0.039	0.0386
1:1000	3.00	0.047	0.044
1:5000	3.69	0.058	0.058
1:10,000	4.00	0.058	0.064
r 0.9670	m 0.020	b -0.015	

Determinación de nitrógeno proteico

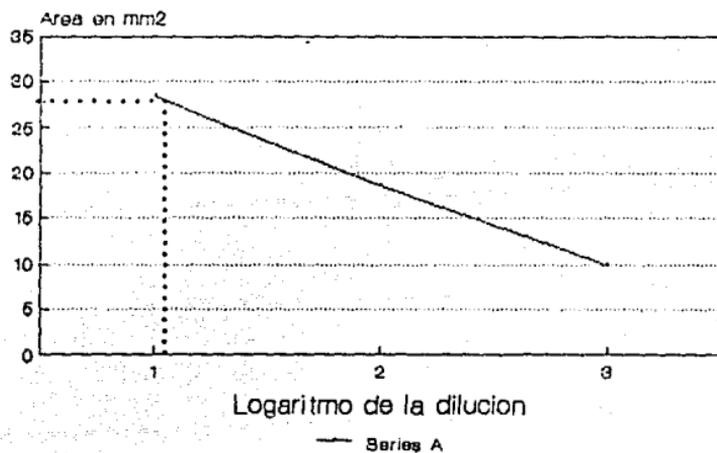
ml del extracto	ml de HCl 0.01136N
0.8	4.2
0.8	4.1
0.8	4.2
0.8	4.3
TOTAL 3.2	16.8

% de Nitrógeno proteico 0.533

Donde:

- X dilución del extracto alérgico
- Yc valores corregidos por regresión lineal
- r coeficiente de correlación lineal
- m pendiente de la línea recta
- b ordenada al origen

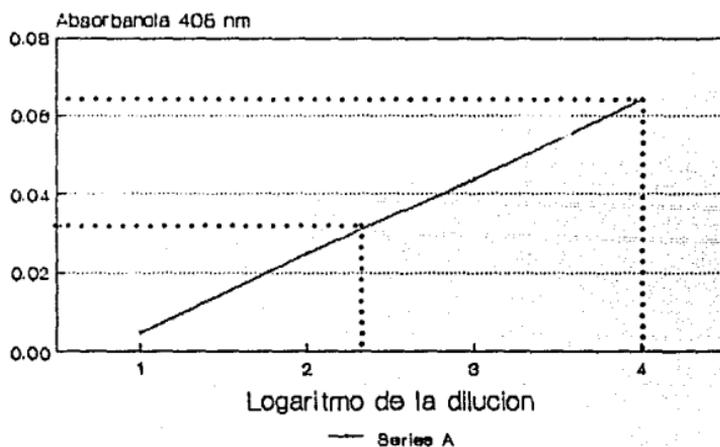
GRAFICA 5 PUNCION EQUIVALENTE DE HISTAMINA



GYNOCON DAOTYLOH

GRAFICA 6

| INHIBICION DE LA PRUEBA RADIOALERGOSORBENTE |



CYNODON DACTYLON

Fraxinus americana.

La área de la roncha producida por la histamina fue de 28.12mm^2 , obteniéndose la dilución 1:31.6 equivalente a 1 HEP (gráfica 7). El 50% de inhibición del RAST se obtuvo con la dilución de extracto alergénico 1:9.54 (gráfica 8).

El contenido de nitrógeno proteico fue de 0.339

TABLE 7

FRAXINUS AMERICANA

PUNCIÓN EQUIVALENTE DE HISTAMINA

- ÁREAS DE LAS RONCHAS MM² -

NÚMERO	HISTAMINA DILUCIÓN DEL EXTRACTO ALERGÉNICO									
	1:1000	1:10	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:5000	1:10EX4	1:10EX5	1:10EX6
1	40.00	20.25	18.06	14.06	12.25	9.00	9.00	-----	-----	-----
2	25.00	6.25	5.29	6.25	4.04	4.00	-----	-----	-----	-----
3	30.64	14.06	8.26	5.06	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	14.06	9.00	7.56	6.25	4.00	-----	-----	-----	-----	-----
5	6.25	6.25	4.00	7.25	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6	10.56	95.05	45.56	42.25	9.00	5.06	4.00	1.00	1.00	1.00
7	16.00	42.25	33.06	25.00	20.25	4.00	-----	-----	-----	-----
8	50.56	14.06	12.25	9.00	7.56	5.06	-----	-----	-----	-----
9	20.25	9.00	4.00	4.00	2.25	-----	-----	-----	-----	-----
10	36.00	14.06	7.56	6.25	4.00	4.00	-----	-----	-----	-----
11	22.56	10.56	9.00	4.00	-----	-----	-----	-----	-----	-----
12	27.56	169.00	138.06	132.25	90.25	81.00	62.25	42.25	16.00	16.00
13	56.00	110.20	52.26	25.00	12.25	-----	-----	-----	-----	-----
14	45.56	22.56	15.01	8.16	4.00	-----	-----	-----	-----	-----
15	42.25	21.39	18.06	10.56	6.89	-----	-----	-----	-----	-----
16	42.16	15.17	12.40	8.70	5.46	3.80	-----	-----	-----	-----
17	35.00	15.00	6.90	6.10	5.50	4.00	-----	-----	-----	-----
18	20.00	11.00	9.00	7.80	6.40	5.00	-----	-----	-----	-----
19	25.00	9.15	6.25	5.89	4.89	4.30	-----	-----	-----	-----
20	37.00	91.60	51.50	70.00	42.00	16.00	-----	-----	-----	-----
\bar{x}	28.12	35.28	24.70	19.94	14.22	12.10	-----	-----	-----	-----

NOTA : LOS ESPACIOS MARCADOS "-----" INDICAN QUE NO HAY RESPUESTA

TABLA 8

Fraxinus americana.

Punción Equivalente de Histamina.

Dilución del extracto	Log. X	Y	Area (mm ²) Yc
1:10	1.0	35.288	33.56
1:50	1.69	24.702	25.66
1:100	2.00	19.946	22.11
1:500	2.69	14.222	14.22
1:1000	3.00	12.101	10.67
	r 0.984	m 11.44	b 45

Inhibición de la prueba radioalergosorbente

Dilución del extracto	Log. X	Absorbancia Y	(405 nm) Yc
1:5	0.69	0.095	0.089
1:10	1.0	0.106	0.100
1:50	1.69	0.111	0.122
1:100	2.0	0.123	0.132
1:500	2.69	0.168	0.155
1:1000	3.0	0.158	0.165
1:5000	3.69	0.195	0.187
1:10,000	4.0	0.196	0.198
	r 0.0975	m 0.032	b 0.067

Determinación de nitrógeno proteico.

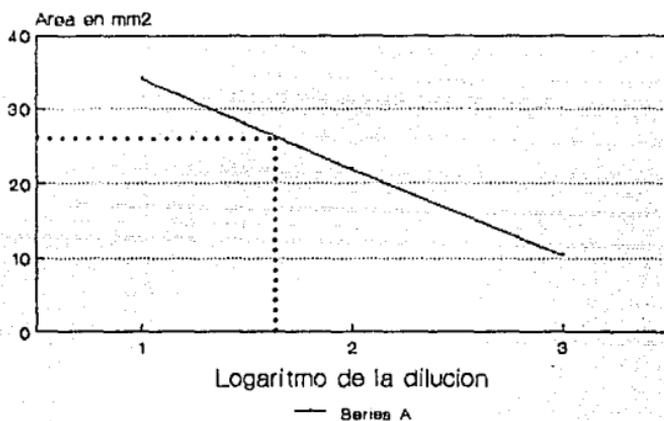
ml del extracto	ml de HCl 0.01136 N
0.2	0.80
0.4	1.10
0.8	3.10
0.8	2.70
TOTAL 2.2	7.70

% de nitrógeno proteico 0.339

Donde:

- X dilución del extracto alérgico
- Yc valores corregidos por regresión lineal
- r coeficiente de correlación lineal
- m pendiente de la línea recta
- b ordenada al origen

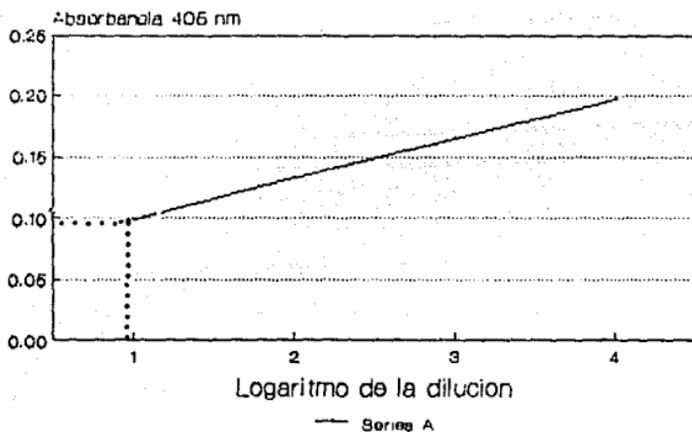
GRAFICA 7 PUNCION EQUIVALENTE DE HISTAMINA



FRAXINUS AMERICANA

GRAFICA 8

INHIBICION DE LA PRUEBA RADIOALERGOSORBENTE



FRAXIMUS AMERICANA

Amaranthus palmeri.

La dilución del extracto alérgico equivalente a 1 HEP fue de 1:181 y se obtuvo al interpolar y tomar el antilogaritmo de la área media de histamina (29.00 mm^2), apreciable en la gráfica 9.

La dilución que inhibió el 50% del RAST fue de 1:97.7 (gráfica 10). Para este alérgeno el contenido de nitrógeno proteico fue de : 0.27%

TABLA 9

AMARANTHUS PALMERI

PUNCIÓN EQUIVALENTE DE HISTAMINA

- ÁREAS DE LAS RONCHAS mm² -

NÚMERO	HISTAMINA DILUCIÓN DEL EXTRACTO ALÉRGICO									
	1:1000	1:10	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:5000	1:10EX4	1:10EX5	1:10EX6
1	22.55	14.06	10.56	8.91	4.00	1.74	-----	-----	-----	-----
2	7.58	14.47	9.00	6.25	2.25	10.00	-----	-----	-----	-----
3	28.00	16.00	8.23	5.06	2.67	-----	-----	-----	-----	-----
4	21.31	13.10	5.61	1.56	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	30.00	20.25	31.58	20.25	14.06	9.25	4.00	-----	-----	-----
6	31.00	19.09	3.49	8.23	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7	40.00	60.06	60.00	42.25	16.47	4.00	-----	-----	-----	-----
8	27.56	31.58	22.84	11.55	6.25	-----	-----	-----	-----	-----
9	45.00	16.00	10.56	7.56	6.26	-----	-----	-----	-----	-----
10	35.00	20.25	6.85	2.25	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11	17.00	12.25	8.23	5.25	5.05	4.00	-----	-----	-----	-----
12	29.00	20.25	9.00	8.23	5.61	-----	-----	-----	-----	-----
13	36.00	45.56	31.48	27.56	9.00	2.25	-----	-----	-----	-----
14	33.00	23.71	13.00	9.00	5.61	-----	-----	-----	-----	-----
15	29.00	21.34	6.85	5.61	-----	-----	-----	-----	-----	-----
16	38.30	30.50	27.00	15.00	8.50	3.10	-----	-----	-----	-----
17	22.50	15.50	5.00	7.00	3.50	3.00	-----	-----	-----	-----
18	31.50	26.50	15.60	12.10	8.40	4.00	-----	-----	-----	-----
19	28.00	12.00	8.80	6.20	4.20	3.00	-----	-----	-----	-----
20	28.50	20.00	15.60	12.80	8.60	4.00	-----	-----	-----	-----
\bar{x}	29.00	22.66	15.69	11.40	6.48	3.61	-----	-----	-----	-----

NOTA: LOS ESPACIOS MARCADOS * ----- * INDICAN QUE NO HAY RESPUESTA

TABLA 10

Amaranthus palmeri

Función Equivalente de Histamina.

Dilución del extracto	Log. X	Y	Area (mm ²)
X			Yc
1:10	1.0	22.66	22.0
1:50	1.69	15.69	15.59
1:100	2.0	11.146	12.71
1:500	2.69	6.98	6.30
1:1000	3.0	3.63	3.42

r 0.992

b 31.294

m 9.289

Inhibición de la prueba radioalergosorbente.

Dilución del extracto	Log. X	Absorbancia	Yc
X		Y	
1:5	0.69	0.003	0.0038
1:10	1.0	0.007	0.0056
1:50	1.69	0.009	0.0098
1:100	2.0	0.012	0.0117
1:500	2.69	0.016	0.0159
1:1000	3.0	0.020	0.0178
1:5000	3.69	0.030	0.0220
1:10,000	4.0	0.032	0.0230

r 0.982

b 0.0083

m 0.006

Determinación de nitrógeno proteico.

ml del extracto	ml de HCl	0.01136 N
0.8	3.3	
0.8	2.0	
0.8	2.2	
0.8	2.2	
0.8	1.9	
TOTAL	11.6	

% de nitrógeno proteico 0.27

Donde:

X dilución del extracto alérgico

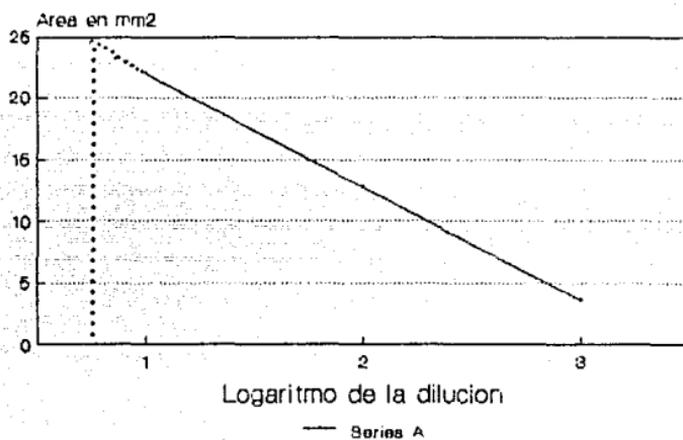
Yc valores corregidos por regresión lineal

r coeficiente de correlación lineal

m pendiente de la recta

b ordenada al origen

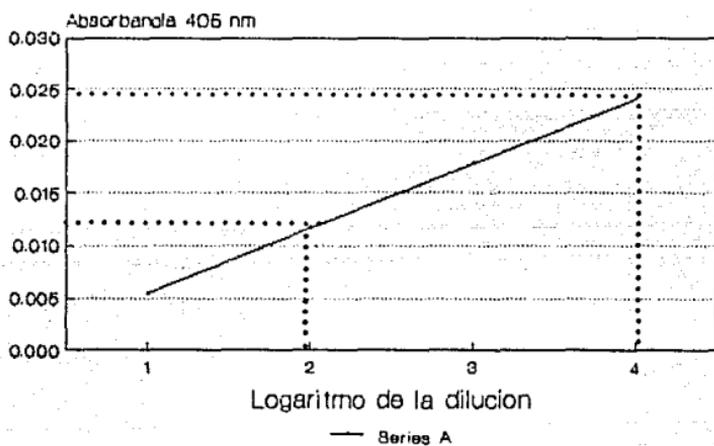
GRAFICA 9 PUNCION EQUIVALENTE DE HISTAMINA



AMAPANTHUS PALMERI

GRAFICA 10

INIBICION DE LA PRUEBA RADICALERGOSORBENTE



AMARANTHUS PALMERI

T A B L A 11

	1 HEP (dilución)	Contenido de	Inhibición del
		Nitrógeno proteico	FAST(dilución)
		(%)	
		X	Y
<u>D. pteronyssinus</u>	1:301.99	1.20	1:239.00
<u>D. farinae</u>	1:229.08	0.85	1:63.090
<u>Cynodon dactylon</u>	1:13.180	0.50	1:239.58
<u>Fraxinus americana</u>	1:31.600	0.33	1:9.5400
<u>Amaranthus palmeri</u>	1:20.000	0.27	1:97.70

Determinación de la correlación entre las variables X y Y de la tabla 11.

$$\begin{array}{ll} n=5 & \Sigma XY = 489.7437 \\ \bar{X} = 0.63 & \bar{Y} = 129.7820 \\ S_x = 0.3904 & S_y = 104.7847 \end{array}$$

Entonces el coeficiente de correlación es

$$r = \frac{\Sigma XY - n \bar{X} \bar{Y}}{(n-1) S_x S_y} = \frac{80.9304}{163.652} = 0.4945$$

El coeficiente de determinación es:

$$r^2 = 0.2445$$

Prueba de hipótesis de linealidad con $\alpha = 0.05$

$$H_0 : \rho = 0$$

$$H_a : \rho \neq 0$$

$$g.l = 4$$

$$t = \frac{r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} = \frac{0.8565}{0.8691} = 0.9854$$

$$t \text{ de tablas} = 2.1318$$

Se acepta H_0 , por lo tanto, no existe correlación entre las variables X y Y, esto es, para que t obtenida sea significativa debe ser mayor o igual a t de tablas

10. DISCUSION DE RESULTADOS

Como se puede observar en las gráficas de Punción Equivalente de Histamina (HEP), la relación entre la área media de la roncha - producida por el extracto alergénico y el logaritmo de la dilución, guarda una relación lineal. En esta curva por interpolación de la área media de la rocha producida por la histamina 1:1000, se obtiene una dilución de extracto alergénico que representa un HEP (tabla 11).

En el HEP se observa que Dermatophagoides pteronyssinus es el más potente de los extractos alergénicos probados. Así una dilución 1:300 (redondeada para facilidad práctica) producirá una roncha de área equivalente a la obtenida con histamina 1:1000 (24.92 mm.²). Tabla 1, gráfica 1. El 50% de inhibición del RAST se obtuvo con la dilución de extracto alergénico 1:240. Entonces se dice que una dilución 1:300 equivale a 1 HEP que a su vez es igual a la dilución 1:240. Esto quiere decir que la dilución 1:240 de cualquier lote --- D. pteronyssinus nos producirá necesariamente una roncha de área media equivalente a la que produjo la dilución 1:300 del extracto alergénico de referencia. También es el de más alto contenido de nitrógeno proteico (1.20). Sin embargo, *Cynodon dactylon* que tuvo sólo el 0.53% de nitrógeno proteico, presentó la misma dilución (1:239.58) - para inhibir el 50% del RAST que D. pteronyssinus.

Amaranthus palmeri que tuvo 0.27 de nitrógeno proteico presentó una dilución más alta (1:97.7) para inhibir el 50% del RAST que --

Fraxinus americana (1:9.54) a pesar de que éste último tuvo el 0.339% de nitrógeno proteico.

Una vez conocido el contenido de nitrógeno proteico y las diluciones que inhiben el 50% del RAST se calculó el coeficiente de correlación "r" para determinar si existe correlación lineal entre estas dos variables. Se observó que no existe correlación lineal entre el contenido de nitrógeno proteico y la capacidad inmunogénica (valorado -- por la inhibición del RAST) de los extractos alérgicos, es decir, -- la inmunogenicidad no depende del contenido de nitrógeno proteico. El valor obtenido de "r" fué de 0.4945 y teóricamente para que una relación se considere lineal se acepta "r" hasta de 0.96. El coeficiente de determinación fué de 0.2445, esto significa que sólo el 24.45% de la variación del RAST es explicado por la variación del contenido de nitrógeno proteico. Además se comprueba con la prueba "t" de Student en donde la "t" calculada fué de 0.9854 y la "t" de tablas de 2.1318 con $p > 0.05$ y para que la "t" calculada sea significativa debe ser mayor o igual a la "t" de tablas.

La determinación de nitrógeno proteico en la estandarización de extractos alérgicos no es indicativa de su actividad alérgica e inmunogénica, debido a que no todas las proteínas tienen actividad; pero sí se pueden estandarizar con los métodos biológicos in vivo e in vitro: punción equivalente de histamina e inhibición del 50% de la prueba radioalergosorbente respectivamente.

En la prueba de la inhibición radioalergosorbente, como ya se había mencionado se busca la concentración de extracto alergénico que inhiba el 50% de los enlaces entre el antígeno en fase sólida - y el anticuerpo IgE obtenido de la mezcla de sueros de los pacientes que habían sido sometidos a la punción equivalente de histamina. A la concentración que inhibe el 50% del RAST se dice que equivale a un HEP. Esta equivalencia es de gran utilidad en la producción de lotes posteriores a los cuales solamente se les correrá la inhibición del RAST utilizando necesariamente la misma mezcla de sueros. Si la dilución de un extracto alergénico X que inhibe el 50% de RAST es mayor que la dilución de referencia, entonces el lote se deberá - diluir con solución de Evans, pero si esta dilución fuera menor, el lote deberá concentrarse por diálisis. En ambos casos lo que se - persigue es que el 50% de inhibición del RAST por el lote X sea -- igual a la dilución de referencia y así garantizar que todos los - lotes tengan la misma potencia alergénica e inmunogénica.

11 CONCLUSIONES.

- .- Se logró la estandarización biológica de los extractos alérgicos mediante la utilización de las unidades HEP y la inhibición del RAST.
- .- No existe relación entre el contenido de nitrógeno proteico de los extractos alérgicos y su capacidad inmunogénica.
- .- Se encontró que el HEP y la inhibición del RAST es una medida biológica útil en el conocimiento de la concentración óptima de extracto alérgico a utilizar en el diagnóstico e inmunoterapia de las enfermedades alérgicas.
- .- Se pueden obtener extractos alérgicos de referencia para estandarizar otros lotes.

12 ANEXOS.

PREPARACION DE SOLUCIONES.

A) Solución de Evans	
Cloruro de sodio	5.00g
Fosfato monobásico de potasio	0.36g
Fosfato de sodio dibásico	1.43g
Fenol	4.00g
Agua destilada c.b.p	1.00L
pH final	7.00 - 0,02
B) Mezcla digestora.	
Sulfato de cobre	3.00g
Óxido de selenio	3.00g
Acido sulfúrico concentrado	300ml
Acido fosfórico	100ml
C) Solución indicadora A	
Fenolftaleína	100mg
Alcohol etílico	100ml
D) Solución indicadora B	
Verde de bromocresol	33mg
Rojo de metilo	66mg
Etanol	100ml
E) Solución de ácido bórico	
Acido bórico	10g
Agua destilada	1.4L
Solución indicadora A	70ml
Solución indicadora B	20ml
F) Acido clorhídrico 0.01136 N	1000ml

- | | | |
|----|--|--------|
| G) | Carbonato de calcio 0.01 N | 1000ml |
| H) | Solución lavadora | |
| | Solución aditiva | 16.0ml |
| | Cloruro de sodio | 9.0g |
| | Agua destilada | 100ml |
| I) | Solución frenadora. | |
| | Carbonato de sodio | 4.2g |
| | Agua destilada | 100ml |
| J) | Solución sustrato. Contiene o-nitrofenil- - galactósido y glutatión | |
| K) | Solución saturada de hidróxido de sodio | |
| | Hidróxido de sodio | 60.0g |
| | Agua destilada | 100ml |
| L) | Mezcla de sueros. Esta se prepara a partir de los sueros de los pacientes que son sensibles al alérgeno, mezclando partes iguales. | |

13. BIBLIOGRAFIA

1. Akiyama, Miyamoto and Horiuchi. A new method of allergen -- standardization.: J. Allergy Clin. Immunol. (1979); 63, 354.
2. Allergy Which Allergens. Allergy and Diagnostics Division. Uppsala, Sweden. 1985.
3. Allergy Yearbook 1984. Pharmacia Allergy and Diagnostics Division. Uppsala Suecia. 1984.
4. Ass KB., Belin L. Weeke B.: Standardization allergen extracts with appropriate methods. The combined use of skin prick testing and radioallergosorbent test. Allergy (1978); 33, 130.
5. Baer H., Maloney CJ., Norman PS.; Marhs DG.: The potency and group L antigen content in six commercially prepared grass pollen extracts. J. Allergy Clin. Immunol. (1974); 54, 157.
6. Baer H., Maloney CJ.: The potency of antigen E content of commercially prepared ragweedextracts. J. Allergy. (1970); 45, 347
7. Björkstén B. Significado clínico de las pruebas de IgE total y RAST Allergy yearbook 1984. ed. Pharmacia D.D. Uppsala Suecia (1984).
8. Bowman W.C., Rand M.J. Farmacología bases bioquímicas y patológicas. 2a. ed. Ed. interamericana, México. (1984) pág. 24.22
9. Bernard MJ., Hoarol R.B.: Methods of radioimmunoassay Academic Press, United States of Americ. (1974), pág. 215.

10. Brian W.: Enzyme Immunoassay (review). Clin. Chem. (1976), 1243.
11. Brighton WD., Topping MD., Menoco.: Activity units for allergen extracts. Clinical Allergy (1972); 9, 591.
12. Castañeda P.R. Bioestadística aplicada. Ed. Trillas, México, D.F. (1980).
13. Chapman MD, Sutherland WM, and Platts-Mell TD.: Recognition of Species-Specific and cross-reacting antigenic determinants on house dust mite (Dermatophagoides) allergen using monoclonal - antibodies. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. (1985); 77, 166.
14. Clausen J. Técnicas inmunoquímicas para la identificación estimación de macromoléculas. Ed. Manual Moderno, México 1975.
15. Cooke R.A.: Allergy in theory and practice. Ed. W.B.Saunders -- Company Philadelphia. U.S.A. (1947), 527.
16. Desbordes J. Problems raised by potency evaluation of allergen preparation. Int. WHO-IABS. on standardization and control of allergens administered to man. (1974).
17. Dieter B.H., Stevens E.: Regulatory Control and Standardization of Allergenic Extracts. Third International Pual-Erich-Seminar. Ed. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. New York. (1983).
18. Engvall Eva.: Enzyme immunoassay and ELISA and SMIT. Meth. Enzimol, 70 (1980), 414.
19. Fradkin. Alergenos. Ed. Mir Moscú, (1980).

20. Frankland A.W.: standardization of allergen preparation. J. Allergy (1980); 35, 216.
21. Frankland AW.: Standardization of allergen preparation. Allergy (1980); 36, 502 .
22. García M.P.: Lo fundamental en alergia. Ed. Doyma, Barcelona España (1986), Pág. 1 a 12.
23. Gleich GJ., Yunginger JW.: Standardization of Allergens Manual of Clinical Immunology. Ed. Noel R. Rose. American Society for Microbiology. Washington (1976), pág. 575.
24. Gleich GJ., Larson JB., Jones RT, Baer H.: Measurement of the potency of allergy extracts by their inhibitory capacities in the radioallergosorbent test. J. Allergy clin. Immunol.(1974); 53, 158.
25. Gómez O.L.: Asma bronquial Clínica y Terapéutica en alergología Janssen Farmacéutica. 1985.
26. Goodman G.A., Goodman S.L. et al. Las bases farmacológicas de la terapia. 7a. edición. Ed. Médica Panamericana. México (1985) pág. 579 a 603.
27. Haida M. Okudiara, H. Ogita t. et al.: Allergens of the house dust mite Dermatophagoides farinae immunochemical studies of four allergenic fraction. J. Allergy Clin. Immunol. (1985); 75, 686.
28. Hansen K. and Werner M. Alergia clínica. Ed. Salvat, España - (1970) pág. 566.

29. Hicks J.J., Díaz Z.J.: Bioquímica e inmunología. Ed. UNAM, México (1988), pág. 409.
30. IUIS Subcommittee for allergen nomenclature, Bull WHO. (1986); 64, 767.
31. Kenny E., Dunsmoor LC. Principles Problems and Strategies in the use of antigenic mixtures for the Enzyme-Linked Immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol, 1974. (1983); 655.
32. Kwong FK.: Allergen extracts and purified allergen in immunotherapy. Anal. Allergy (1981); 47, 162.
33. Lawlor GJ., Fischer TJ. Manual de alergia e inmunología. Salvat Editores. Barcelona, España (1985).
34. Le Mao J. Dandeu, Rabellon J.P. et al.: Comparison of antigenic and allergenic composition of two partially purified extracts - from Dermatophagoides mite cultures. J. Allergy Clin. Immunol. (1983); 71, 588.
35. Lessof M.H. Alergia. Aspectos clínicos e inmunológicos. Ed. REVERTE, S.A., España. (1986).
36. Lombardero MG., González R., et al.: Evaluación de la actividad biológica y composición alérgica de extractos alérgicos. Allergol et Immunopathol (1986); 14, 3, 189.
37. Lombardero M., Carreira J.: A comparison between pyridinic and non pyridinic extraction of allergenic materials. Ann. Allergy in Press. 1986.

38. Marques de Cantú M.J.: Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. Ed. UNAM, México, D.F. (1988).
39. Martínez F.T. El papel de la histamina en la respuesta inmune Alergia (1985); 32, 89.
40. Middleton E. Jr., Reed E.C., Ellis E.: Allergy principles and practices. 2a. edición. Ed. Mosby Co. St. Louis Missouri U.S.A. 1983.
41. Mullas MS, Sánchez, M.M. Acaros en Colombia Bionimia ecología y distribución. Ed. Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas y Proyectos Especiales. Bogotá (1980).
42. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. Lancet -- (1984); 1, 1572.
43. Norman S.P.: Significado clínico de la IgE. Educación Médica - Continua. Tribuna Médica.
44. Ogawa M. Ishizaka K. y Terry M. Biologic Properties of proteins myeloma Am. J. (1971); 51, 193.
45. Phadezym RAST 60. Enzyme immuno assay. Pharmacia Uppsala Sweden.
46. Ramírez O.A., Baltazar R. Estudio ilustrado de los pólenes del aire de México, más comunes, (1961).
47. Ramírez F.W., Olive P.A.: Estandarización y caracterización de los extractos alérgicos. Alergia (1980); 35, 93.

48. Roitt I.M. Essential Immunology. 4a. edición. Ed. Blackwell Scientific Publication. Boston Melbourne U.S.A. (1970) pág. 566.
49. Salazar M.M. La alergia en la teoría y en la práctica. Ed. Francisco Méndez Oteo, México. (1958).
50. Siraganian P.R.: Refinements in the automated fluorometric Histamina. J. of Immunological Methods (1975); 7, 283.
51. Siraganian P.R.: Automated histamina analysis for in vitro - allergy testing. J. Allergy Clin. Immunol. (1977); 59, 214.
52. Stites P.D., Hugh F.H. et al. Inmunología Básica y Clínica. 5a. edición. Ed. Manual Moderno, México. 1985.
53. Stull A. Cooke R.A., Tennat J.: The allergen content of pollen extracts: its determination and deterioration. J. Allergy - (1933), 4, 455.
54. The clinical value of total and Specific IgE determinations, Pharmacia Diagnostics AB. Uppsala Suecia (1979).
55. Thorell J. Larson M.S.: Radioimmunoassay and related techniques Methodology and Clinical Applications. Ed. Mosby U.S.A. (1978).
56. Turkeltaub C.P.: Assignment of bioequivalent Allergy Units - based on biological standardization. Arb. aus. dem. Paul --- Ehrlich Instit. (1988).
57. Turkeltaub. C.P.: Biological standardization of a allergenic extracts Current concepts in allergy and clinical Immunology. (1977), 17, 1.

58. Turkeltaud C.P.: In vivo standardization in allergy principles and practice, 3a. edición, Ed. C.V. Mosby Co. St. Louis U.S.A. (1988). pág. 388 a 401.
59. Turkeltaud P.C., Rastogi S.C., et al.: A standardized quantitative skin-test assay of allergen potency and stability, studies on the allergen dose response curve and affect of wheal, erithema and patient selection on assay result. J.Allergy Clin. Immunol. (1982); 70, 343.
60. Voorhorst R., Spieksma F.: Dermatofagoides et altitude. Bull Actualite Therap. (1975); 1085.
61. Voorhorst R. Spieksma-Boezeman. Is a mite the producer of the -- house dustallergen. Allergie in Asthma (1964), 10, 329.
62. Yunginger W.J.: Allergen standardization: 1984. J. Allergy Clin. Immunol. (1984); 73, 316.